

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
Международное бюро



(43) Дата международной публикации:
29 сентября 2005 (29.09.2005)

РСТ

(10) Номер международной публикации:
WO 2005/089739 A1

(51) Международная патентная классификация ⁷:
A61K 31/02, 9/107, A61P 7/00, 7/08

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2005/000058

(22) Дата международной подачи:
7 февраля 2005 (07.02.2005)

(25) Язык подачи: русский

(26) Язык публикации: русский

(30) Данные о приоритете:
2004106722 1 марта 2004 (01.03.2004) RU

(71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме
(US)): ГЕРМАНОВ Евгений Павлович [RU/RU];
ул. Годовикова, д. 2, кв. 96, Москва, 129085 (RU)
[GERMANOV, Evgeny Pavlovich, Moscow (RU)].

(71) Заявители и

(72) Изобретатели: КУЗНЕЦОВА Ирина Николаевна
[RU/RU]; пер. Ульяна Громова, д. 8, кв. 67, Санкт-
Петербург, 191036 (RU) [KUZNETSOVA, Irina
Nikolaevna, St.Petersburg (RU)]; МАЕВСКИЙ Ев-
гений Ильич [RU/RU]; микрорайон АВ, 1, кв. 17,
Пушино, Московская обл., 142290 (RU) [MAIEV-
SKY, Evgeny Ilich, Puschino, (RU)].

(74) Агент: РЫБАКОВ Юрий Владимирович, а/я 55,
Санкт-Петербург, 197136 (RU) [RIBAKOV, Jury
Vladimirovich, St.Petersburg (RU)].

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида национальной охраны): AE, AG,
AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BW,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида национальной охраны): ARIPO
патент (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский патент
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
европейский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU,
MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), патент OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована

С отчётом о международной поиске.

В отношении двухбуквенных кодов, кодов языков и дру-
гих сокращений см. «Пояснения к кодам и сокращениям»,
публикуемые в начале каждого очередного выпуска Бюл-
летеня РСТ.

(54) Title: MEDICAL EMULSION OF PERFLUORORGANIC COMPOUNDS AND METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF

(54) Название изобретения: ЭМУЛЬСИЯ ПЕРФТОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНА-
ЧЕНИЯ И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Abstract: The invention relates to medicine, in particular to medications for treating blood losses, hypoxic and ischemic states, for improving a blood oxygen supply and for preserving isolated perfused organs and tissues. The inventive medical emulsion of perfluororganic compounds comprises rapidly excretable perfluororganic compounds such as perfluorodecalin, perfluoractilbromide, a perfluororganic additive embodied in the form of a mixture of perfluorinated tertiary amines and phospholipids in the form of a water-salt dispersion. Said perfluorodecalin and perfluoractilbromide are contained in the composition of the rapidly excretable perfluororganic compounds at a ratio ranging from 10:1 to 1:10. The mixture of perfluorinated tertiary amines is embodied in the form of the mixture of perfluorotripropylamine and the coproducts thereof: cis- and trans-isomers perfluor-1-propyl 3,4-dimethylpiperidone and perfluor-1-propyl-4-methylpiperidine. The inventive method for producing the emulsion consists in producing the water-salt dispersion of phospholipids, in homogenising the perfluororganic compounds therein at a high pressure and in heat sterilisation of the final emulsion. The storage life of the inventive emulsion in the unfrozen state thereof at a temperature of +4 °C is equal to at least 6 months during which the biocompatibility of said emulsion with a biological medium (blood, plasma or serum) is preserved.

[Продолжение на след. странице]



WO 2005/089739 A1



(57) Реферат: Изобретение относится к области медицины, в частности, к лекарственным средствам, предназначенным для лечения кровопотерь, гипоксических и ишемических состояний, улучшения доставки кислорода кровью, сохранения изолированных перфузируемых органов и тканей. Эмульсия перфторорганических соединений медицинского назначения содержит быстровыводящиеся перфторорганические соединения перфтордекалин и перфтороктилбромид, перфторорганическую добавку, представляющую собой смесь перфторированных третичных аминов, и фосфолипиды в виде дисперсии в водно-солевой среде. Перфтордекалин и перфтороктилбромид содержатся в композиции быстровыводящихся перфторорганических соединений в соотношении от 10:1 до 1:10. Смесь перфторированных третичных аминов представляет собой смесь перфтортрипропиламина и его копродуктов: цис- и транс-изомеров перфтор-1-пропил-3,4-диметилпирролидона и перфтор-1-пропил-4-метилпиперидина. Способ получения эмульсии включает получение дисперсии фосфолипидов в водно-солевой среде, гомогенизацию под высоким давлением перфторорганических соединений в дисперсии фосфолипидов и тепловую стерилизацию готовой эмульсии. Срок хранения эмульсии в незамороженном виде при + 4° С составляет не менее 6 месяцев, при этом, сохраняется биосовместимость эмульсии с биологической средой (кровью, плазмой или сывороткой).

Эмульсия перфторорганических соединений медицинского назначения и способ ее получения

Изобретение относится к области биофизики и медицины, в частности к лекарственным средствам, предназначенным для лечения кровопотерь, гипоксических и ишемических состояний, улучшения доставки кислорода кровью, сохранения изолированных перфузируемых органов и тканей.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

ПАВ	— поверхностно-активное вещество
П-268, F-268	— проксанол 268, плороник-268
ПФД	— перфтордекалин
ПФМЦП	— перфторметилциклогексилпиперидин
ПФОБ	— перфтороктилбромид
ПФОЖ	— перфторорганическая жидкость, представляет смесь перфтортрипропиламина и его копродуктов: цис- и транс-изомеры перфтор-1-пропил-3,4-диметилпирролидона и перфтор-1-пропил-4-метилпиперидин.
ПФС, ПФУ	— перфторуглероды, перфторированные соединения
ПФТБА	— перфтортрибутиламин
ПФТПА (ПАФ-3)	— перфтортрипропиламин
СФЛ	— фосфолипиды сои
ФЛ	— фосфолипиды
ЯФЛ	— фосфолипиды яичного желтка
n	— волновой экспонент
C_v	— объемное содержание фторуглеродной фазы в эмульсиях ПФУ (мл/дл)
a	— средний диаметр частиц
λ	— длина волны
I_p	— индекс реактогенности

Успех разработки инфузионных сред, включающих в себя эмульсии перфторорганических соединений (ПФС) во многом зависит от физико-химических свойств выбранных ПФС, физико-химических свойств эмульсий на их основе и технологии получения эмульсий ПФС.

ПФС, предназначенные для создания на их основе медицинских препаратов, представляют собой полностью фторированные органические соединения разных классов. По внешнему виду это прозрачные бесцветные жидкости без запаха, большой плотности — примерно в 2 раза тяжелее воды. Необычайная прочность связи C–F (485,6 кДж/моль) приводит к тому, что межмолекулярные силы у этих соединений очень слабые. Проявлением слабых межмолекулярных сил в ПФУ является их аномально высокая способность растворять газы, в том числе и газы крови.

Благодаря прочности связи C–F, ПФС характеризуются химической инертностью. ПФС плохо растворяются в H_2O и не подвергаются метаболизму в организме. Химическая инертность ПФС не означает инертности биологической. ПФУ, введенные внутривенно в виде эмульсий, задерживаются в органах и тканях, причем время пребывания в органах зависит от природы ПФС и дозы вводимой эмульсии.

Изучение биологических свойств ПФС разных классов показали, что скорость выведения из органов зависит от ряда связанных между собой физико-химических параметров этих соединений: структуры и молекулярной массы, температуры кипения и упругости пара, а также критической температуры растворения ПФУ в гексане ($T_{кр}$). $T_{кр}$ — это температура, при которой смешиваются друг с другом равные объемы исследуемого соединения и гексана. $T_{кр}$ рассматривают как меру относительной растворимости ПФУ в липидах, которая характеризует скорость их прохождения через мембраны. Чем ниже $T_{кр}$, тем лучше соединение растворимо в липидах и тем оно быстрее выводится из организма. В табл. 1 приведены значения физико-химических параметров, используемых в качестве критерия выбора для ПФУ медицинского назначения.

Таблица 1


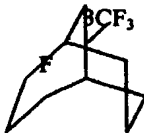


Значения критической температуры растворения в гексане ($T_{кр}$), упругости пара (P) и периода полувыведения из органов ($t_{1/2}$) для различных ПФС [1].

Перфторированные соединения	ММ	$T_{кр}$	P , мм рт.ст (37°)	$t_{1/2}$, сутки
Бицикло[4.3.0]нонан	412	13	33	4
Декалин	462	22	12	7
Декагидроаценафтен	524	24	2	7
N-(4-метилциклогексилпиперидин)	595	38	1	60 (90)
1-пропил-2 метилпиперидин	483	35	19	24
Трипропиламин	521	43	17	65
Трибутиламин	671	61	1	900
Дигексиловый эфир	652	59	2	500

Согласно приведенным данным, четко прослеживается корреляция между $T_{кр}$ и $t_{1/2}$ (период полувыведения). Для упругости пара такой зависимости не обнаруживается. В большей степени связаны между собой $T_{кр}$ и ММ ПФС. Оптимальным диапазоном ММ для ПФУ считается интервал 460–520. В целом, все предложенные критерии по отбору ПФС для биологических целей не противоречат друг другу, но носят качественный характер. В настоящее время внимание исследователей, занятых разработкой и изучением эмульсий ПФС, сосредоточено на относительно небольшом числе соединений. В таблице 2 и 3 приведены структурные формулы и основные физико-химические характеристики наиболее известных ПФС.

Таблица 2.

Структурные формулы наиболее известных и перспективных ПФУ.

<p>Перфтордекалин (ПФД)</p>  <p>ММ 462</p>	<p>Перфтортрипропиламин (ПФТПА)</p> $\begin{array}{c} \text{C}_3\text{F}_7-\text{N}-\text{C}_3\text{F}_7 \\ \\ \text{C}_3\text{F}_7 \end{array}$ <p>ММ 521</p>	<p>Перфтортрибутиламин (ПФТБА)</p> $\begin{array}{c} \text{C}_4\text{F}_9-\text{N}-\text{C}_4\text{F}_9 \\ \\ \text{C}_4\text{F}_9 \end{array}$ <p>ММ 671</p>
<p>Перфтортриметилбицикло-нонан (ПФТМН)</p>  <p>ММ 562</p>	<p>Перфторметилизохинолин (ПФМИХ)</p>  <p>ММ 495</p>	<p>Перфторметилциклогексилпиперидин (ПФМЦП)</p>  <p>ММ 595</p>
<p>Перфтороктилбромид (ПФОБ)</p> $\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_6-\text{CF}_2\text{Br}$ <p>ММ 499</p>	<p>бис-перфторбутилэтен (F-44E)</p> $\text{C}_4\text{F}_9-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_4\text{F}_9$ <p>ММ 464</p>	<p>бис-фторгексилэтен (F-66E)</p> $\text{C}_6\text{F}_{13}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{F}_{13}$ <p>ММ 664</p>

В ходе изучения первичных биологических свойств различных ПФС было выработано важное требование — отсутствие в них неидентифицируемых примесей. Присутствие примесей с неизвестными свойствами может исказить истинную картину поведения основного вещества при внутривенном введении животным (задержка в органах, токсичность, влияние на различные системы организма).

Таблица 3.

Физико-химические свойства ПФС, составляющих основу медицинских препаратов [2].

Свойства	ПФД	ПФТПА	ПФМЦП	ПФОБ	ПФДБ
Химическая формула	$C_{10}F_{18}$	$C_9F_{21}N$	$C_{12}F_{23}N$	$C_8F_{17}Br$	$C_{10}F_{21}Br$
Молекулярная масса, г/моль	462	521	595	499	599
Температура кипения, °C	142	131	168	143	180
Давление пара, мм рт.ст, (37°C)	12,7	18,0	2,0	10,5	1,5
Критическая температура растворения, $T_{кр}$ °C	22	44	40	-20	7
Растворимость кислорода мл/100мл (об.%), (37 °C)	40	45	40	53	—
Период полувыведения, $t_{1/2}$	7	65	90 (60)	4	40

Примечание: ПФД/ПФТПА составляют основу препарата Флюосол-ДА (Fluosol DA); ПФД/ПФМЦП — препарата Перфторан; ПФОБ/ПФДБ являются основой различных марок препарата Оксигент (Oxugent).

Жидкие ПФС являются плохими растворителями для различных водорастворимых биологически активных веществ. Поэтому для применения ПФС в качестве кислородпереносящих сред их диспергируют в водном растворе эмульгатора до образования тонкодисперсных эмульсий.

Способность к газообмену для эмульсий ПФС определяется общим количеством кислорода, содержащимся в эмульсии, концентрация которого подчиняется закону Генри: прямо пропорциональна парциальному давлению кислорода. Принцип физического растворения газов в ПФС распространяется и на эмульсии ПФС. Количество O_2 , растворенного в эмульсии, зависит от содержания фторуглеродной

фазы и не зависит от размера частиц, то есть количество растворенного в эмульсиях ПФУ кислорода близко к расчетным значениям при сложении значений содержания этого газа в каждой фазе в отдельности (количество растворенного кислорода в водной фазе плюс количество растворенного кислорода в ПФС). Содержание инертных газов в смесях эмульсия ПФС/плазма также подчиняется правилу сложения объемов газа в каждой фазе. Таким образом, количество любого газа, содержащегося в эмульсии ПФУ, может быть рассчитано в соответствии с физическими законами их растворимости, исходя из парциального давления газа и объемного соотношения фракций ПФС/ H_2O . Это значит, что содержание кислорода в эмульсиях ПФУ будет тем выше, чем выше его парциальное давление или напряжение (pO_2) и доля фторуглеродной фазы.

Специфическое (функциональное) действие любого препарата при введении в организм определяется его переносимостью, которую характеризуют величиной LD_{50} , и отсутствием побочного действия, проявляющегося главным образом в виде реактогенности. Величина LD_{50} для эмульсий ПФУ в значительной мере зависит от размера частиц. Средний диаметр частиц для эмульсий ПФУ не должен превышать 0,2 мкм. При увеличении доли крупных частиц (со средним диаметром, превышающим 0,4 мкм) с 3% до 10% LD_{50} для названных эмульсий снижается более чем в 2 раза. Выявление возможной реактогенности у эмульсий ПФУ — один из наиболее сложных вопросов, который необходимо решать при создании на их основе лекарственной формы для внутрисосудистого введения. При введении реактогенного препарата человеку может развиваться разная по степени проявления «аллергическая» реакция от легкого покраснения кожи вплоть до анафилактической реакции с остановкой дыхания и сердца.

Большинство исследователей считают, что реактогенность в основном зависит от природы эмульгатора, используемого для диспергирования фторуглеродной основы эмульсии и формирующего адсорбционный (поверхностный) слой вокруг частиц. Сложилось устойчивое представление о том, что в эмульсиях первого поколения причиной реактогенности был неионогенный ПАВ блок-сополимер поли-

оксиэтилена и полиоксипропилена Pluronic F 68 (F-68) и что его замена на природные фосфолипиды полностью ликвидирует проблемы реактогенности. Эта точка зрения не совсем верна, поскольку жировые эмульсии несмотря на то, что они стабилизированы природными фосфолипидами, все таки обладают реактогенностью. Реактогенность эмульсий ПФС также не может быть ликвидирована просто использованием фосфолипидов в качестве эмульгатора и стабилизатора ПФС. Действительно, оказалось, что реактогенность эмульсий ПФС определяется прежде всего свойствами поверхности эмульгированных частиц, то есть состоянием стабилизирующего частицы слоя эмульгатора. Однако, наряду с химической структурой — природой молекул ПАВ, ключевыми параметрами, определяющими как стабильность дисперсной системы, так и возможность развития побочных реакций являются: прочность связи ПАВ с масляным «ядром» частиц эмульсии, характер расположения молекул ПАВ на поверхности, плотность их упаковки, выраженность адсорбционных свойств по отношению к белкам и другим биологически активным молекулам, находящимся в кровотоке, и, наконец, размер частиц эмульсии. О последнем параметре, следует сказать особо: уменьшение среднего размера частиц эмульсии в препарате Перфторан, стабилизированным только блок-сополимером полиоксиэтилена и полиоксипропилена — проксанолом 268, являющимся близким аналогом F-68, способствовало резкому уменьшению частоты развития побочных реакций. Отсюда ясно, что поверхностные явления (т.е. взаимодействие двух гетерогенных систем — эмульсии и крови или плазмы) в поведении эмульсий ПФУ при внутривенном введении играют решающую роль при формировании рецептуры и технологии получения эмульсий ПФС. И здесь следует опытным путем подбирать как состав масляного «ядра» и взаимодействующего с ним ПАВ, так апробировать приемлемость принятой технологии получения эмульсий ПФС.

При разработке представленной в настоящем изобретении эмульсии ПФС медицинского назначения и способа ее получения мы исследовали каждую рецептуру и элемент технологии по биологическому эффекту с помощью анимационной модели. Известно, что у кроликов одним из эквивалентов реактогенной реакции на

введении эмульсий ПФС является резкое падение содержания нейтрофильных лейкоцитов в периферической крови. В эксперименте при оценке возможной реактогенности эмульсий ПФС используется показатель, называемый индекс реактогенности I_p , который определяется по следующей формуле: $I_p = C_k/C_o$, где C_k и C_o количество нейтрофилов в процентах к исходному уровню в контрольной и опытной группах животных. Если величина I_p через 5 и 20 минут после введения препарата не превышает 3, то вероятность реактогенности минимальна [3].

Известны различные способы получения эмульсий ПФС. Эмульсии масла в воде, к которым относятся эмульсии ПФС и фторуглеродная основа является масляной фазой, получают с затратой энергии. Измельчение масляной фазы проводят с помощью воздействия ультразвука или механическим путем.

При ультразвуковом воздействии диспергирование происходит за счет разрывающих усилий резких локальных изменений давления, которые возникают вследствие двух причин. Во-первых, чередования локальных сжатий и расширений в жидкости при прохождении волны; во-вторых, воздействия кавитаций, т.е. образования и спадания полостей, заполняемых растворенным в жидкости газом. Энергия и мощность ультразвукового воздействия, необходимого для получения субмикронной эмульсии столь велики, что наряду с диспергированием приводят к разрыву связи C-F. В результате в водной фазе эмульсии появляется высоко токсичные концентрации ионов F^- , порядка 3–5 мМ. Эмульсия с таким содержанием F^- не пригодна ни для возмещения кровопотери, ни для сохранения перфузируемых органов, ее следует очищать от избыточного количества F^- посредством пропускания через ионообменную смолу. Вторым недостатком эмульсий ПФС, полученных с помощью ультразвукового диспергирования, является чрезвычайно широкая величина дисперсии: при среднем размере частиц 0,1 мкм может встречаться значительная доля частиц с размером более 0,4 мкм и частиц с размером менее 0,01 мкм.

Механическое диспергирование за счет встряхивания или энергичного перемешивания позволяют получать только грубодисперсные эмульсии ПФС с неприемлемым для биомедицинского использования размером: более мм. Для получения

тонкодисперсных эмульсий используют метод выдавливания вещества дисперсной фазы через тонкие отверстия в дисперсионную среду под большим давлением (метод экструзии), что приводит к разрыву движущей струи жидкости на капли. Диспергирование вызывается градиентом давления и силами гидравлического трения. Обычно наработку эмульсий ПФС осуществляют на гомогенизаторах высокого давления. Закрепление достигнутого на гомогенизаторах измельчения частиц, т. е. стабилизация эмульсий, достигается с помощью ПАВ или эмульгаторов. Их стабилизирующее действие объясняется двумя причинами: во-первых, снижением избытка межфазной поверхностной энергии или снижением поверхностного натяжения; во-вторых, образованием структурно-механического барьера (адсорбционного слоя), обеспечивающего устойчивость частиц и препятствующего их контакту или слипанию.

Среди большого числа ПАВ только немногие отвечают требованиям возможности их использования для получения препаратов, предназначенных для внутривенного введения (табл. 4.).

Таблица 4

Основные поверхностно-активные вещества, используемые для получения эмульсий ПФУ

Название	Структурная формула	Основные характеристики
Проксанол-268 (Плюроник F-68)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x(\text{CH}-\text{CH}_2\text{O})_y- \\ \\ -(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x \text{OH} \end{array}$	Синтетический блок-сополимер, ММ~13000 (П-268) и ~9000 (F-68), x — число звеньев блока ПОЭ*, y — число звеньев ПОПР. Хорошо растворим в воде.
Фосфолипиды	$\begin{array}{c} \text{R}_2-\text{COOCH}_2 \\ \\ \text{R}_1-\text{COOCH} \\ \quad \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{P}-(\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{R}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Природное соединение. R ₁ и R ₂ — различные цепи жирных кислот.
Лецитин (яично-го желтка)	R ₃ =N(CH ₃) ₃	ММ — 760–870. Практически не растворим в воде.

* ПОЭ — полиокись этилена; ПОПР — полиокись пропилена.

До настоящего времени используются главным образом два эмульгатора для получения эмульсий ПФС — проксанол-268 (плуроник-F-68) и фосфолипиды природного сырья (яичного желтка, сои и др.)

Структура проксанола не соответствует характерным особенностям молекул водорастворимых ПАВ, которые имеют полярную головку (гидрофильная часть) и неполярный хвост (гидрофобная часть). У проксанола две цепи полиоксиэтилена (ПОЭ) обуславливают гидрофильный характер молекул, образуя водородные связи с молекулами H_2O . Метильные группы блока полиоксипропилена (ПОПр) обуславливают липофильные свойства его молекулы. Соотношение блоков ПОЭ : ПОПр для F-68 и П-268 в среднем одинаково и составляет 80:20. Стабилизирующее действие этих эмульгаторов главным образом обусловлено стерическим эффектом защитной пленки, образуемой молекулами ПАВ вокруг частиц ПФУ. При этом наряду с ПАВ, связанным в адсорбционном слое, значительная часть молекул ПАВ образует разнообразные мицеллярные структуры в водной фазе, в том числе свободные от ПФС. Между молекулами ПАВ, находящимися в адсорбционном слое и в мицеллах в водной фазе, устанавливается динамическое равновесие необходимое для стабилизации адсорбционного слоя с одной стороны, а с другой — нарушающее плотность упаковки молекул ПАВ в адсорбционном слое при длительном хранении.

Фосфолипиды (ФЛ) представляют собой смесь соединений природного происхождения, общая структура которых отражена в табл. 4. ФЛ не растворимы в воде и одновременно не являются хорошим липофильным агентом по отношению к различным ПФС, хотя в бислое частиц фосфатидилхолина (ФХ) частично растворяются ПФД и ПФТПА. Взаимодействие ФЛ и ПФС в водной фазе носит двойственный характер. Возможно заключение ПФС в ламелярные структуры ФЛ и (или) образование монослоев ФЛ, необратимо связанных с поверхностью частиц. Возможно существование неоднородных частиц в эмульсиях ПФС/ФЛ, т. е. частиц, покрытых защитным слоем ФЛ и свободных ФЛ. Эта неоднородность может быть

связана с особенностями технологического процесса и/или с избытком ФЛ по отношению к фторуглеродной фазе.

Для тонкодисперсных эмульсий ПФС определяющим механизмом снижения степени дисперсности (укрупнение частиц) является изотермическая или молекулярная перегонка вещества дисперсной фазы от мелких частиц в более крупные частицы путем диффузии молекул ПФС через дисперсионную среду. Этот процесс называют еще созреванием эмульсии по Оствальду или переконденсацией. Движущей силой этого процесса является большее давление насыщенного пара над частицами меньших размеров сравнительно с более крупными. В этом случае важным параметром является также степень растворимости ПФС в водной среде. Предотвращение переконденсации может иметь решающее значение для сохранения агрегативной устойчивости эмульсий ПФУ, т.е. сохранения ими дисперсности и индивидуальности частиц. Основные пути дестабилизации — молекулярная диффузия и меньшая значимость флокуляции или коагуляции — характерны и для относительно разбавленных эмульсий ПФУ, в которых содержание фторуглеродной фазы не превышает 20% (по объему), и для более концентрированных эмульсий ПФУ, в которых объемная фракция фторуглеродной фазы составляет 50%.

Известны пути стабилизации эмульсий ПФУ. Общий принцип стабилизации коллоидных систем — предотвращение механизмов их разрушения. Введение в эмульсии ПФС/ФЛ сахаров и отрицательно заряженных соэмульгаторов (минорных компонентов ФЛ) предотвращает процесс флокуляции частиц за счет изменения пространственных взаимодействия молекул ПАВ в адсорбированном слое, а также и за счет увеличения электростатических сил отталкивания между частицами.

Снижение основного процесса разрушения эмульсий ПФС, вызываемого молекулярной диффузией, достигают обычно введением во фторуглеродную основу второго компонента (дополнительного перфторированного соединения) менее растворимого в воде, имеющего более высокую температуру кипения и замедляющего этот процесс.

Этот принцип стабилизации использован при разработке препаратов Флюозол-ДА, Перфторан и Оксигент. В таблице 5 представлены сводные данные по составу и физико-химическим свойствам названных препаратов.

Таблица 5.
Сводные данные по составу препаратов Флюосол-ДА (Япония), Перфторан (Россия), Оксигент (США) /2/.

Составные компоненты препаратов	Концентрация (% вес/объем)				
	Флюосол ДА	Перфторан	Оксигент		
			AF0104	AF0143	AF0144
ПФД	14	13	—	—	—
ПФТПА	6	—	—	—	—
ПМЦП	—	6,5	—	—	—
ПФОВ	—	—	90	87	58
ПФДБ	—	—	—	3	2
Плюроник F-68 (проксанол-268)	2,72	4	—	—	—
Фосфолипиды	0,4	—	4	5,4	3,6
Калия олеат	0,032	—	—	—	—
Буфер	CO_3^{-2}	CO_3^{-2}	PO_4^{-3}	PO_4^{-3}	PO_4^{-3}
Двухвалентные катионы	+	+	—	—	—

В первых двух препаратах к ПФД, составляющему большую часть масляной фазы, введены добавки перфторированных соединений ПФТПА и ПФМЦП, более высококипящих и менее растворимых в воде. В качестве эмульгатора использован водорастворимый плюроник F-68 с добавками ФЛ (Флюозол ДА) или его аналог проксанол-268 (Перфторан). По физико-химическим параметрам препараты не очень отличаются друг от друга. Их относят к препаратам первого поколения, общий недостаток которых заключается в необходимости хранения в замороженном

состоянии из-за недостаточной стабильности. В случае препарата Оксигент к его фторуглеродной основе — ПФОБ добавлен ПФДБ, который имеет более высокую температуру кипения и менее растворим в воде. Преимущество препарата Оксигент, относящегося ко второму поколению, определяется возможностью хранения его в не замороженном состоянии. Кроме того, ПФОБ, составляющий фторуглеродную основу препарата, быстро выводится из организма, примерно с той же скоростью, что и ПФД ($t_{1/2} \sim 4$ и 7 дней соответственно).

Препарат Оксигент является коммерческим названием инфузионных сред, несколько различающихся по составу.

Роль эмульгатора при получении эмульсий не сводится только к снижению межфазового поверхностного натяжения в системе $H_2O/ПФС$, необходимому для уменьшения дисперсности. Изменение природы эмульгатора может повлиять на скорость процесса молекулярной диффузии. Перспективными признаны фторированные ПАВ-ФПАВ, содержащие в своей молекуле гидрофобную фторированную и гидрофильную нефторированную части. Большой успех по синтезу ФПАВ для ПФУ достигнут в последние годы французской школой химиков [4]. Общая структура синтезированных ФПАВ представляет комбинацию полифторированной цепи и полярной головки. В качестве соединительного звена этих элементов берется углеводородная цепь. Полярная головка выбирается из природных веществ или их производных. ФПАВ, содержащие в качестве полярной головки спирты или производные сахаров, проявляют синергизм с плуроником F-68. Использование в качестве полярной головки фосфолипидов, фосфатов сахаров или фосфатидилхолина в составе ФПАВ увеличивает стабильность эмульсий ПФУ, содержащих природные ФЛ в качестве эмульгатора. Предложен также новый класс смешанных ФПАВ для стабилизации ПФУ [4]. Молекулы этого класса ФПАВ представляют собой блок из двух линейных составных частей — углеводородной и перфторированной. Общие формулы этих соединений записываются следующим образом:



Авторы называют эти молекулы “*dowel*”, что означает в дословном переводе «шпонка» или иначе соединительный элемент, скрепка.

Считается, что молекулы ФПАВ общего линейного строения RH-RF выполняют роль закрепляющего элемента, углеводородный конец которого входит в липидную пленку, окружающую частицы ПФУ, а другой, фторированный, входит в масляную фазу ПФУ, то есть молекулы типа RH-RF улучшают адгезивные свойства поверхностного слоя ПАВ.

До настоящего времени ПФД и ПФОБ являются наиболее приемлемыми соединениями при создании эмульсий медико-биологического назначения в силу того, что они наиболее быстро выводятся из организма по сравнению с другими перфторированными соединениями.

Известны патенты [5, 6], в которых предложены составы кровезаменителя, фторуглеродной основой которого являются смеси двух ПФС (ПФД/ПФМЦП или ПФД/ПФТБА или ПФОБ/ПФМЦП); смеси трех ПФС (ПФОБ/ПФД/ПФМЦП или ПФОБ/ПФД/ПФТБА) и даже смеси четырех ПФС (ПФОБ/ПФД/ПФМЦП/ПФТБА), взятых в различных соотношениях. Диспергируют указанные смеси с помощью водорастворимого эмульгатора проксанола П-268. Использование этого эмульгатора не позволяет хранить эмульсии названных составов при положительной температуре. Кроме того после размораживания эмульсии данного типа имеют ограниченный срок хранения при +4 °С (не более 1 месяца). Это их главный недостаток.

Запатентованы эмульсии с использованием фторированных ПАВ (ФПАВ). Микро эмульсии ПФС, содержащие ФПАВ [7], до настоящего времени не нашли практического применения в качестве инфузионной среды, скорее всего, в силу недостаточной стабильности в условиях *in vivo*. Известен другой состав эмульсий ПФС, полученных с использованием смешанного ФПАВ, содержащего в молекуле фторофильную и липофильную части [8]. Эти эмульсии хотя и сохраняют средний диаметр частиц при положительных температурах хранения, но только в течение 3 месяцев.

Известен патент [9], в котором источником ФЛ для получения эмульсий ПФС служит жировая эмульсия Liposyn 10%. В качестве фторуглеродной основы эмульсий запатентованы три группы ПФС. В первую группу входят перфторциклоалканы или перфторалкилциклоалканы (в том числе ПФД, ПФметилдекалин, ПФпергидрофенантрен и др.). Вторая группа включает в себя перфторалкил насыщенные гетероциклические соединения. Третью группу составляют перфторированные третичные амины — ПФТПА, ПФТБА и др. Включен в число используемых ПФС и ПФОБ. Однако с помощью названной эмульсии Liposyn 10% не удалось получить стабильную эмульсию ПФД. Максимальный срок ее хранения составил 25 дней.

В патенте [10] использованы ФЛ яичного желтка для получения эмульсий ПФС. Содержание фторуглеродной фазы в этих средах варьируется в широких пределах от 10 до 50 об. %, а содержание ФЛ — от 0,5 до 7 вес. %. В качестве масляной фазы в патенте используется какой-либо один ПФС, выбранный из широкого класса соединений. В частности группа перфторгидрофенантронов с числом атомов фтора от 1 до 24, а также ПФД; перфторированные амины; ПФОБ; перфторметиладамантан и перфторпергидрофенантрен.

Основное внимание в двух вышеназванных патентах уделяется методам сохранения различных органов и систем с использованием полученных эмульсий ПФС. Перед началом физиологических экспериментов наработанные эмульсии смешивают с кристаллоидными растворами и/или с онкотическими агентами (альбумин, гидроксиэтилкрахмал). Предложенные эмульсии хотя и относятся к эмульсиям второго поколения, но имеют существенный недостаток. В обоих патентах отсутствуют результаты наблюдений за стабильностью предложенных эмульсий, т.е. сохранении размера частиц при длительных сроках хранения (более месяца). Патенты [9, 10] мы рассматриваем в качестве аналогов.

Более близкой по сущности к заявляемой эмульсии ПФС является эмульсия, предложенная в [11]. Эта эмульсия, взятая нами за прототип, относится к числу эмульсий второго поколения и содержит быстро выводящееся перфторированное

соединение в количестве от 40 до 50 об.% и перфторированную добавку более высококипящего соединения в количестве от 5 до 10 об. %. В качестве быстро выводящегося ПФС используют ПФД или ПФОБ (основной компонент), а в качестве добавки — ПФМЦП. Эмульгатором служат ФЛ яичного желтка или сои.

ПФМЦП является стабилизатором эмульсии, снижающим скорость процесса молекулярной диффузии (переконденсации) основного компонента ПФД или ПФОБ и используется при получении эмульсий другого состава, в частности препарата Перфторан. Главным недостатком заявленной в [11] эмульсии ПФС является относительно большой средний диаметр частиц — больше 0,2 мкм.

Задачей настоящего изобретения является увеличение стабильности эмульсии и улучшения ее качества, т. е. сохранения биосовместимости с биологической средой (кровью, плазмой или сывороткой) при хранении в незамороженном состоянии не менее 6–12 месяцев.

Для этого предложена эмульсия ПФС медицинского назначения, содержащая быстро выводящееся соединение ПФД или ПФОБ, перфторорганическую (перфторированную) добавку и фосфолипид, характеризующаяся тем, что в качестве быстро выводящегося компонента используется композиция из смеси ПФД и ПФОБ, перфторированная добавка представляет собой смесь перфторированных третичных аминов, а фосфолипиды используются в виде дисперсии в вводно-солевой среде.

Эмульсия характеризуется тем, что суммарная концентрация ПФС в эмульсии находится в пределах от 2 до 40 об. % ;

Эмульсия характеризуется тем, что композиция быстро выводящихся ПФС содержит ПФД и ПФОБ в соотношении от 10:1 до 1:10, перфторорганическая добавка составляет от 1% до 50 % от общего содержания ПФС в эмульсии и содержит: смесь перфтортрипропиламина и его копродуктов: цис- и транс- изомеры перфтор-1-пропил-3,4-диметилпирролидона и перфтор-1-пропил-4-метилпиперидин, и дополнительно перфтор-N-метилциклогексилпиперидин и его копродукты.

Эмульсия характеризуется тем, что содержит дисперсию ФЛ яичного желтка или дисперсию ФЛ сои или их смесь в водно-солевой среде в концентрации от 0,2 до 5 вес.%.

Эмульсия, характеризуется тем, что дисперсия ФЛ в водно-солевой среде содержит адьювант в количестве от 1 до 15 % от суммарного содержания ФЛ; адьювантом является растительное масло: соевое, подсолнечное или касторовое, или их смесь в эффективном соотношении в виде двойной или тройной смеси.

Эмульсия характеризуется тем, что в состав водно-солевой среды входят натриевые и калиевые соли хлоридов и фосфатов и моносахарид маннитол в воде для инъекций и концентрация компонентов водно-солевой среды имеет осмотическое давление в диапазоне от 100 до 350 мосмолей на литр.

Эмульсия характеризуется тем, что средний диаметр частиц не превышает 0,2 мкм и находится в пределах 0,06–0,2 мкм.

Способ получения заявленной эмульсии ПФС методом гомогенизации, характеризующийся тем, что процесс проводят в несколько этапов, включающих получение дисперсии ФЛ в водно-солевой среде, гомогенизирование ПФС в дисперсии ФЛ, тепловую стерилизацию готовой эмульсии и последующее хранение в замороженном виде при +4 °С не менее 6 месяцев.

Способ получения заявленной эмульсии ПФС характеризуется тем, что дисперсию ФЛ в водно-солевой среде получают гомогенизацией под высоким давлением не менее 100 атм с последующей тепловой стерилизацией.

Способ получения заявленной эмульсии ПФС характеризуется тем, что гомогенизируют ПФС в дисперсии ФЛ под давлением от 300 до 650 атм.

Способ получения заявленной эмульсии ПФС характеризуется тем, что дисперсию ФЛ и эмульсию ПФС стерилизуют при температуре 100 °С.

Как указано выше, задачей изобретения является увеличение стабильности эмульсии и улучшения ее качества, т.е. сохранения биосовместимости с биологической средой (кровью, плазмой или сывороткой) при хранении в незамороженном состоянии не менее 6–12 месяцев. Термин «биосовместимость» включает в себя

различные значения и нуждается в уточнении применительно к эмульсиям ПФС. В цитируемых выше патентах [8–11] под термином биосовместимость используются следующие представления — относительно большая скорость выведения из органов выбранных ПФС; способность сохранять ткани и органы, через сосуды которых перфузируется эмульсия ПФС; сравнительно низкая токсичность для животных (на уровне не менее двух объемов циркулирующей крови). Эти представления не исключают друг друга, но не отражает самого первого этапа — взаимодействия дисперсных частиц ПФС с плазмой и кровью при попадании эмульсии ПФС в сосудистое русло. Мы рассматриваем явление биосовместимости, начиная со степени выраженности взаимодействия (реагирования) эмульсии ПФС с биологической средой (кровью, плазмой или сывороткой). Результат этого взаимодействия можно оценивать не только *in vivo*, но прежде всего в опытах *in vitro* по степени стабильности эмульсии при влиянии на нее ряда факторов, моделирующих повреждение адсорбционного слоя при хранении и попадании эмульсии в кровоток.

Качество и стабильность эмульсий ПФС принято характеризовать, исходя из размера частиц: средний диаметр частиц в эмульсиях ПФУ не должен превышать 0,2–0,3 мкм. Такой подход недостаточен для дисперсных препаратов медико-биологического назначения, вводимых внутривенно. Это связано с тем, что частицы ПФУ, как чужеродный материал, при попадании в сосудистое русло взаимодействуют с белками и молекулами других соединений, находящихся в плазме, а также с клетками крови. Общий характер взаимодействия зависит от свойств поверхности частиц. Функциональная активность (газотранспортная функция) эмульсий ПФУ также во многом зависит от совместимости поверхности эмульгированных частиц с кровью и плазмой, поскольку в случае, например, активации системы комплемента на чужеродной поверхности происходит запуск каскада реакции, вызывающих спазм сосудов и нарушение регионарного кровотока. Следует отметить также, что стабильность эмульсий в условиях *in vitro* во многом определяется свойствами адсорбционного слоя ПАВ вокруг частиц (прочность, топография поверхности и др.). В свете сказанного вопрос о стабильности эмульсий ПФУ не может

быть решен только с помощью обычных коллоидно-химических методов изучения размера частиц без оценки особенностей структуры. Весьма актуальным является разработка для этой цели достаточно простых методов и подходов, позволяющих получать информацию о размере частиц и целостности их структуры. При этом необходимо также уточнить само понятие структуры применительно к эмульсиям ПФУ.

Прогресс в изучении стабильности эмульсий ПФУ *in vitro* и *in vivo* связан с расширением и углублением самого понятия структуры эмульсий ПФУ и разработкой методов ее изучения. Понятие стабильности какого-либо препарата или вещества определяется устойчивостью его свойств. Параметры, используемые для характеристики свойств эмульсий ПФУ, не являются исчерпывающими характеристиками их стабильности. В наших опытах мы расширили представления о критериях стабильности эмульсий ПФУ с учетом особенностей их структуры.

Стабильность эмульсий ПФУ принято оценивать на основании изменения размера частиц при хранении. Такой чисто коллоидно-химический подход недостаточен. Для эмульсий ПФУ, являющихся основой препаратов, предназначенных для внутривенного введения, большое значение приобретает информация об их стабильности не только в опытах *in vitro*, но и возможность предсказывать их стабильность при циркуляции в сосудистом русле. Получение таких сведений может быть достигнуто, если более четко обозначить представление о структуре эмульсий ПФУ. Частицы эмульсий ПФУ имеют структуру двухслойного шара, в центре которого находится ПФУ (ядро частицы), а на поверхности слой эмульгатора (оболочка) [12]. Толщина оболочки эмульгатора мала и составляет не более 5–10% от диаметра частиц. Тем не менее поведение эмульсий ПФУ в сосудистом русле (взаимодействие с белками плазмы и клетками крови, скорость выведения и др.), а также стабильность при длительном хранении во многом будут зависеть от прочности и состояния поверхностно-активного вещества вокруг частицы. Поэтому необходимо одновременно получать информацию о размере частиц и структурных изменениях, имеющих место в исследуемых средах при тех или иных воздействиях.

Для теоретического описания и анализа изменения структуры эмульсий ПФС, как основы инфузионных сред, предложено выделить следующие представления [13]:

1) "Общую структуру" эмульсий ПФУ и ее изменения. Этот аспект характеризуется средним диаметром и распределением частиц по размерам;

2) "Микроструктуру", которая определяется состоянием эмульгатора в оболочке, степенью его взаимодействия с ПФУ, взаимным расположением молекул ПАВ, их упорядоченностью, плотностью упаковки, степенью окисленности, фазовым состоянием структурированных молекул.

До настоящего времени все исследователи ограничивались анализом «общей структуры», что крайне недостаточно, так как стабильность эмульсий, биосовместимость и, в частности, поверхностные свойства частиц и их адсорбционная способность определяются «микроструктурой».

Представленные в настоящем изобретении эмульсии ПФС сравнивались с прототипом и исследовались, во-первых, по параметрам, характеризующим изменение «общей структуры» в разные сроки хранения полученных эмульсий.

Во-вторых, моделировали воздействие повреждающих эмульсию факторов в условиях, позволяющих оценивать состояние «микроструктуры» эмульсии ПФУ. В частности использовали «стресс-воздействие» в виде разведения эмульсии водой и определяли изменение параметров по сравнению с нативной эмульсией. Разведение эмульсий ПФУ водой нарушает сложившееся равновесие между адсорбционным слоем ПАВ (оболочкой) и молекулами ПАВ в дисперсионной среде. Поэтому оно имеет определенную предсказательную силу в отношении сохранения стабильности метастабильной системы (эмульсии ПФС) или ее разрушения.

Кроме того, наблюдали изменение микроструктуры и совместимость эмульсий ПФС при контакте с сывороткой крови как модельной системой (изучение биосовместимости эмульсий ПФС в опытах *in vitro*). Взаимодействие двух гетерогенных дисперсных систем — сыворотки крови и эмульсии ПФУ — характеризует изменение поверхностных свойств частиц при попадании в кровоток и изменение

микроструктуры эмульсий ПФУ при хранении. Наблюдения за динамикой «общей структуры» и «микроструктуры» проводили в одни и те же сроки в течение 12 месяцев хранения эмульсий ПФУ.

Для выявления различий в названных параметрах состояния при хранении эмульсий ПФС требовались методы и подходы, которые не вносили бы дополнительных возмущений в исследуемую систему при проведении соответствующих измерений. В качестве таковых были выбраны, апробированы и разработаны оптические методы контроля.

Для оценки общей структуры нами был выбран метод спектротурбидиметрии или метод спектра мутности (СМ) [14]. Его же использовали для оценки распределения частиц по размерам в исследуемых эмульсиях после их центрифугирования и фракционирования. Изменение микроструктуры эмульсий или поверхностных свойств частиц, вызванное изменением взаимосвязей молекул ПАВ в адсорбционном слое вокруг ПФС, оценивали с помощью косвенного метода нахождения индекса взаимодействия (K_r) исследуемой эмульсии с сывороткой крови по отношению к физиологическому раствору: относительная мутность $K_r = \tau_1/\tau_2$, где τ_1 и τ_2 — мутности смесей «сыворотка/эмульсия» и «сыворотка/физиологический раствор» при соответствующих изменениях соотношений компонентов смесей [15]. Дополнительно для подтверждения неизменности природы эмульгированных частиц ПФУ (отсутствия свободных ФЛ) проводили сопоставление экспериментальных и расчетных значений τ : $\tau_{\text{расч.}} = \sum N_i \cdot \tau_i$ ($\sum N_i = 1$), где τ_i и N_i мутность и доля выделенной фракции; $\tau_{\text{эсп.}}$ — мутность той же пробы эмульсии до фракционирования.

I. Ниже приведены конкретные составы предложенной эмульсии ПФС в соответствии с настоящим изобретением.

Состав 1. Эмульсия содержит 40 об.% фторуглеродной фазы (C_v) в виде ПФД и ПФОБ, взятых в соотношении 1:1, с перфторированной добавкой в виде смеси

перфтортрипропиламина и его копродуктов: цис- и транс- изомеров перфтор-1-пропил-3,4-диметилпирролидона и перфтор-1-пропил-4-метилпиперидин в количестве 50% от суммарного содержания основных ПФС, стабилизированных в эмульгированном состоянии 5% дисперсией ФЛ, содержащей ЯФЛ и адъювант в виде касторового масла, взятого в концентрации 15 % от суммарного содержания ЯФЛ, в водно-солевой среде следующего состава: 2 мМ (115 мг в литре) хлорида натрия, 2 мМ калия фосфорнокислого однозамещенного (310 мг безводной соли в литре), 7,5 мМ натрия фосфорнокислого двухзамещенного (460 мг безводной соли в литре), 318 мМ маннита (58 г маннитола в литре) в воде для инъекций. Осмотическое давление эмульсии составляет 310 мОсмолей на литр. Средний размер частиц эмульсии 0,195 мкм.

Состав 2. Эмульсия по примеру (составу) 1, отличающаяся тем, что Эмульсия содержит 20 об.% фторуглеродной фазы (C_v) в виде ПФД и ПФОБ, взятых в соотношении 10:1, с перфторированной добавкой смеси перфтортрипропиламина и его копродуктов: цис- и транс- изомеров перфтор-1-пропил-3,4-диметилпирролидона и перфтор-1-пропил-4-метилпиперидин, дополнительно содержащей перфтор-N-метилциклогескипиперидин в суммарном количестве 25% от содержания основных ПФС, стабилизированных в эмульгированном состоянии 2,5 % дисперсией ФЛ, содержащей СФЛ и адъювант в виде соевого масла, взятого в концентрации 10 % от суммарного содержания ЯФЛ, в водно-солевой среде следующего состава: 2 мМ натрия фосфорнокислого однозамещенного (276 мг безводной соли в литре), 7,5 мМ натрия фосфорнокислого двухзамещенного (460 мг безводной соли в литре), 278 мМ маннита (50 г маннитола в литре) в воде для инъекций. Осмотическое давление эмульсии составляет 270 мОсмолей на литр. Средний размер частиц эмульсии 0,1 мкм.

Состав 3. Эмульсия по примеру 1, отличающаяся тем, что Эмульсия содержит 15 об.% фторуглеродной фазы (C_v) в виде ПФД и ПФОБ, взятых в соотношении 1:10, с перфторированной добавкой смеси перфтортрипропиламина и его ко-

продуктов: цис- и транс- изомеров перфтор-1-пропил-3,4-диметилпирролидона и перфтор-1-пропил-4-метилпиперидин, дополнительно содержащей перфтор-N-метилциклогексилпиперидин в суммарном количестве 5% от содержания основных ПФС, стабилизированных в эмульгированном состоянии 2 % дисперсией ФЛ, содержащей смесь ЯФЛ и СФЛ, а также адъювант в виде подсолнечного масла, взятого в концентрации 5 % от суммарного содержания ФЛ, в водно-солевой среде следующего состава: 1 мМ натрия фосфорнокислого однозамещенного (138 мг безводной соли в литре), 3,7 мМ натрия фосфорнокислого двузамещенного (230 мг безводной соли в литре), 100 мМ маннита (18 г маннитола в литре) в воде для инъекций. Осмотическое давление эмульсии составляет 105 мОсмолей на литр. Средний размер частиц эмульсии 0,08 мкм.

Состав 4. Эмульсия по примеру 1, отличающаяся тем, что Эмульсия содержит 10 об.% фторуглеродной фазы (C_v) в виде ПФД и ПФОБ, взятых в соотношении 2:1, с перфторированной добавкой смеси перфтортрипропиламина и его копродуктов: цис- и транс- изомеров перфтор-1-пропил-3,4-диметилпирролидона и перфтор-1-пропил-4-метилпиперидин, дополнительно содержащей перфтор-N-метилциклогексилпиперидин в суммарном количестве 0,2% от содержания основных ПФС, стабилизированных в эмульгированном состоянии 2 % дисперсией ФЛ, содержащей ЯФЛ, а также адъювант в виде смеси подсолнечного и касторового масла, взятого в концентрации 2 % от суммарного содержания ЯФЛ, в водно-солевой среде следующего состава: 1 мМ натрия фосфорнокислого однозамещенного (138 мг безводной соли в литре), 3,7 мМ натрия фосфорнокислого двузамещенного (230 мг безводной соли в литре), 90 мМ маннита (13 г маннитола в литре) в воде для инъекций. Осмотическое давление эмульсии составляет 100 мОсмолей на литр. Средний размер частиц эмульсии 0,07 мкм.

Состав 5. Эмульсия по примеру 1, отличающаяся тем, что Эмульсия содержит 2 об.% фторуглеродной фазы (C_v) в виде ПФД и ПФОБ, взятых в соотношении 1:2, с перфторированной добавкой смеси перфтортрипропиламина и его копродуктов: цис- и транс- изомеров перфтор-1-пропил-3,4-диметилпирролидона и пер-

фтор-1-пропил-4-метилпиперидин, дополнительно содержащей перфтор-N-метил-циклогексилпиперидин в суммарном количестве 10 % от содержания основных ПФС, стабилизированных в эмульгированном состоянии 0.2 % дисперсией ФЛ, содержащей СФЛ, а также адъювант в виде смеси соевого и касторового масла, взятого в концентрации 5 % от суммарного содержания СФЛ, в водно-солевой среде следующего состава: 2 мМ (115 мг в литре) хлорида натрия, 2 мМ натрия фосфорнокислого однозамещенного (276 мг безводной соли в литре), 7,5 мМ натрия фосфорнокислого двузамещенного (460 мг безводной соли в литре), 318 мМ маннита (58 г маннитола в литре) в воде для инъекций. Осмотическое давление эмульсии составляет 350 мОсмолей на литр. Средний размер частиц эмульсии 0,06 мкм.

Состав 6. Эмульсия по примеру 1, отличающаяся тем, что Эмульсия содержит 10 об.% фторуглеродной фазы (C_v) в виде ПФД и ПФОБ, взятых в соотношении 4:1, с перфторированной добавкой смеси перфтортрипропиламина и его копродуктов: цис- и транс- изомеров перфтор-1-пропил-3,4-диметилпирролидона и перфтор-1-пропил-4-метилпиперидин в суммарном количестве 4 % от содержания основных ПФС, стабилизированных в эмульгированном состоянии 2 % дисперсией ФЛ, содержащей СФЛ, а также адъювант в виде смеси подсолнечного, соевого и касторового масла, взятого в концентрации 4 % от суммарного содержания СФЛ, в водно-солевой среде следующего состава: 2 мМ натрия фосфорнокислого однозамещенного (276 мг безводной соли в литре), 7,5 мМ натрия фосфорнокислого двузамещенного (460 мг безводной соли в литре), 200 мМ маннита (36 г маннитола в литре) в воде для инъекций. Осмотическое давление эмульсии составляет 225 мОсмолей на литр. Средний размер частиц эмульсии 0,09 мкм.

В таблице 6 приведены составы эмульсии в соответствии с изобретением по примерам 1–6.

Таблица 6

Состав эмульсий ПФС по примерам 1-6.

№ примера	Сv об. %, ПФД/ПФ ОБ	ПФС добавка, относит. содерж.	Дисперсия ФЛ (вес.) %	Адьювант, относит. содержание	Осмоляемость	Размер частиц	Водная фаза состав в мМ
№1	40 об% 1:1	ПФОЖ 50%	ЯФЛ 5%	Кастор. 15%	310 мОсм	0,195 мкм	2 KCl 2 NaH ₂ P 7,5 Na ₂ HP 318 маннит
№2	20 об% 10:1	ПФОЖ ПФМЦП 25%	СФЛ 2,5%	Соевое 10%	270 мОсм	0,10 мкм	2 NaH ₂ P 7,5 Na ₂ HP 278 маннит
№3	25 об% 1:10	ПФОЖ ПФМЦП 5%	ЯФЛ СФЛ 2%	Подсолн. 10%	110 мОсм	0,08 мкм	1 NaH ₂ P 3,7 Na ₂ HP 100 маннит
№4	10 об% 2:1	ПФОЖ ПФМЦП 0,2%	ЯФЛ 2%	Подсолн. кастор. 2%	100 мОсм	0,07 мкм	1 NaH ₂ P 3,7 Na ₂ HP 95 маннит
№5	2 об% 1:2	ПФОЖ ПФМЦП 10%	СФЛ 0,2%	Соевое кастор. 5%	350 мОсм	0,06 мкм	2 NaCl 2 NaH ₂ P 7,5 Na ₂ HP 318 маннит
№6	10 об% 4:1	ПФОЖ 4 %	СФЛ 2%	Подсолн. соевое кастор. 2%	225 мОсм	0,09 мкм	2 NaH ₂ P 7,5 Na ₂ HP 200 маннит

II. Далее приведены конкретные примеры реализации способа получения эмульсий ПФС заявляемого состава и их физико-химические параметры.

Пример 1. Эмульсию готовили в асептических условиях.

1.1. Для приготовления 1 л эмульсии, содержащей 10 об. % ПФС, приготавливали 1 % дисперсию ФЛ.

- 1.2. Первый этап приготовления дисперсии ФЛ: в стерильную круглодонную колбу наливали 100 мл 10 % спиртового раствора ЯФЛ и отгоняли спирт на ротационном испарителе, добавляли 1 г касторового масла (концентрация адъюванта 10 % от содержания ЯФЛ) и наливали 900 мл водно-солевого раствора.
- 1.3. Для приготовления водно-солевого раствора также использовали апирогенную воду. Порошок однозамещенного фосфорнокислого натрия, порошок двузамещенного фосфорнокислого натрия и кристаллический маннит высушивали в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 2 часов. Затем навески 0,138 г безводного однозамещенного фосфорнокислого натрия, 0,523 г безводного двузамещенного фосфорнокислого натрия и 50,0 г маннита растворяли в асептических условиях в ламинарном боксе в 1 л апирогенной воды. Полученную водно-солевую композицию пропускали через стерильный фильтр фирмы Миллипор с диаметром пор 0,4 мкм.
- 1.4. Смесь фосфолипидов, растительного масла и водно-солевого раствора механически перемешивали в колбе до образования гомогенной суспензии молочно-желтоватого цвета. Полученную суспензию ФЛ переносили в стерильную емкость гомогенизатора высокого давления.
- 1.5. Гомогенизатор предварительно стерилизовали пропусканием перегретого водяного пара, пропусканием медицинского спирта в объеме 500 мл и промыванием 500 мл горячей апирогенной воды.
- 1.6. Суспензию ФЛ диспергировали в гомогенизаторе при давлении 100 атм 4-х кратным пропусканием до образования полупрозрачной гомогенной жидкости — дисперсии ФЛ, которую разливали во флаконы. Через флаконы пропускали стерильный инертный газ (азот, аргон или смесь азота с углекислотой) в течение 2–4 минут.
- 1.7. Флаконы закрывали резиновыми пробками и завальцовывали под обкатку алюминиевыми колпачками. После этого флаконы стерилизовали термообработкой при 100 °С в течение 1 часа. Флаконы хранили при комнатной температуре до начала следующего этапа получения эмульсии ПФС.

1.8. Следующий этап заключался в обработке ПФС. Смешивали 72 мл ПФД с 8 мл ПФОБ. К 80 мл этой композиции ПФС добавляли 20 мл ПФТПА. Полученную композицию смеси ПФД и ПФОБ с ПФС добавкой смешивали с равным объемом спирта медицинского. Перфторуглеродную фазу как более тяжелую отделяли от спирта на делительной воронке. Отделенную от спирта смесь ПФС смешивали с 3-х кратным объемом апиrogenной воды, встряхивали и также отделяли на делительной воронке (удельный вес ПФС почти в два раза превышает удельный вес воды).

1.9. Далее получали эмульсию. В рабочую емкость гомогенизатора вносили 900 мл дисперсии ФЛ и 100 мл обработанной смеси ПФС (композицию ПФД/ПФОБ=9/1 + ПФТПА — 20 %), все содержимое рабочей емкости механически перемешивали и подвергали диспергированию под давлением 500 атм, пропуская весь объем 8 раз через камеру высокого давления, до образования полупрозрачной опалесцирующей желтоватой жидкости — субмикронной эмульсии ПФС. Эмульсию разливали во флаконы по 100 мл, закрывали резиновыми пробками и завальцовывали алюминиевыми колпачками.

1.10. Флаконы с эмульсией ПФС стерилизовали нагреванием при 100°С в течение 1 часа, охлаждали и хранили при 4 °С в течение года.

Состав полученной эмульсии: содержание фторуглеродной фазы (C_v) равно 10 об. %, соотношение ПФД/ПФОБ равно 9/1, относительное количество ПФТПА в смеси ПФС составляет 20 %, концентрация ЯФЛ — 1 вес.%, концентрация касторового масла — 0,1% (относительное количество касторового масла как адьюванта в суспензии равно 10 % от суммарного содержания ЯФЛ). Серия 1.

Определяли вязкость этой серии в вискозиметре ВПЖ-2. Ее величина составила 0,953 спз. Для сравнения вязкость препарата Перфторан с тем же содержанием фторуглеродной фазы составляет 2,5 спз.

Пример 2. Эмульсию ПФС готовили, как описано в примере 1, идентичного состава. Только в качестве адьюванта к ЯФЛ брали смесь двух масел: касторового

и масла сои в соотношении 1/1. Состав C_v — 10 об. %, соотношение ПФД/ПФОБ равно 9/1, относительное содержание ПФТПА составляет 20 %, концентрация ЯФЛ — 1 вес. %, относительное содержание адьюванта — смеси двух масел (касторовое масло/соевое масло=1/1) — составляет 10 %. Серия 2.

Пример 3. Эмульсию ПФС готовили, как описано в примере 1, но в объеме 800 мл и содержанием 20 об. % ПФС, идентичного примеру 1 состава. В круглодонную колбу вносили 200 мл 10 % спиртового раствора соевых ФЛ (СФЛ). Спирт отгоняли на ротационном испарителе, добавляли в колбу адьювант — смесь соевое масло/касторовое масло в соотношении $\frac{1}{2}$ — в суммарном количестве 3 г, что составляло 15 % от общего количества СФЛ. Водно-солевой раствор содержал 0,276 г безводного однозамещенного фосфорнокислого натрия, 1,046 г безводного двузамещенного фосфорнокислого натрия и 10,0 г маннита. В колбу, содержащую СФЛ и адьювант, вносили 1 л водно-солевого раствора, встряхивали, переносили в гомогенизатор, диспергировали, разливали во флаконы, стерилизовали, как в примере 1. Подготавливали фторуглеродную фазу. К 160 мл ПФД добавляли 40 мл ПФОБ, отбирали 160 мл этой композиции и смешивали ее с 40 мл ПФТПА. 200 мл полученной смеси ПФС после очистки прокапывали в гомогенизатор, в котором находилось 800 мл дисперсии СФЛ. Полученную эмульсию разливали во флаконы и стерилизовали.

Состав эмульсии: C_v = 20 об.%, соотношение ПФД/ПФОБ = 8/2; относительное содержание ПФТПА — 20 %; концентрация СФЛ равна 2 вес. %, относительное содержание адьюванта (смесь двух масел — масло сои/масло касторовое в соотношении $\frac{1}{2}$) составляет 15 %. Серия 3.

Пример 4. Эмульсию получали, как в примере 1, за исключением того, что соотношение компонентов в композиции ПФД/ ПФОБ также было тем же самым и равнялось 8/2. К 170 мл этой композиции добавляли 30 мл ПФМЦП, перемешивали взбалтыванием, очищали стандартным образом и прокапывали в гомогенизатор,

где находилось 800 мл дисперсии СФЛ (полученной, как в примере 3), содержащей тот же адъювант — смесь двух масел: масло сои/масло касторовое в соотношении $\frac{1}{2}$ в количестве 15 % от содержания СФЛ. Эмульсию диспергировали под давлением 400 атм.

Состав эмульсии: $C_v = 20$ об. %; соотношение ПФД/ПФОБ = 8/2; относительное содержание ПФМЦП — 15 %; концентрация СФЛ равна 2 вес. %, относительное содержание адъюванта (смеси двух масел: масло сои/масло касторовое в соотношении $\frac{1}{2}$) в дисперсии СФЛ составляет 15 %. Серия 4.

Пример 5. Эмульсию получали как в примере 1, за исключением того, что использовали другое количество ЯФЛ для получения дисперсии ФЛ. 50 мл спиртового раствора ЯФЛ поместили в круглодонную колбу, отогнали спирт на ротационном испарителе, поместили туда 0,6 г подсолнечного масла, добавили 0,95 л солевого раствора, перемешали встряхиванием и гомогенизировали при давлении 150 атм. Композицию ПФД/ПФОБ в соотношении 5/5 готовили смешением 25 мл ПФД с 25 мл ПФОБ. 49,5 мл этой смеси смешали с 0,5 мл ПФТПА. Приготовленные 50 мл смеси ПФС, после очистки прокапывали в гомогенизатор, куда предварительно было залито 0,95 л суспензии ЯФЛ. Гомогенизацию предварительной грубой дисперсии осуществляли при давлении 350 атм. Розлив и стерилизацию тонкодисперсной эмульсии проводили согласно указанным правилам.

Состав полученной эмульсии: $C_v = 5$ об. %; соотношение ПФД/ПФОБ = 5/5; относительное содержание ПФТПА составляет 1 %; концентрация ЯФЛ равна 0,5 вес. %; относительное содержание подсолнечного масла, взятого в качестве адъюванта, составляет 12 %. Серия 5.

Пример 6. 50 мл 10 % спиртового раствора СФЛ поместили в круглодонную колбу, отогнали спирт по описанной методике, поместили туда 0,6 г соевого масла, добавили 950 мл солевого раствора, после перемешивания перенесли в гомогенизатор для получения дисперсии при давлении 180 атм. После стерилизации ее использовали для получения эмульсии.

Композицию ПФД/ПФОБ (соотношение 5/5) получали смешиванием 25 мл ПФД с 25 мл ПФОБ. К 49,5 мл этой композиции добавили 0,5 мл ПФМЦП. После очистки спиртом 50 мл полученной смеси прокапали ее в гомогенизатор, в котором находилось 950 мл дисперсии СФЛ. Гомогенизацию проводили, как было указано ранее, в два этапа. Сначала при давлении 200 атм, а потом при давлении 500 атм.

Состав полученной эмульсии: $C_v = 5$ об. %; соотношение ПФД/ПФОБ = 5/5; относительное содержание ПФМЦП составляет 1 %; концентрация СФЛ равна 0,5 вес. %; относительное содержание соевого масла, взятого в качестве адьюванта, составляет 12 %. Серия 6.

Пример 7. Готовили суспензию с концентрацией СФЛ, равной 0,2 вес. %. Для этого 20 мл спиртового раствора СФЛ поместили в ротационный испаритель, отогнали спирт, поместили туда 0,02 г в качестве адьюванта смесь двух масел подсолнечного и соевого в соотношении 1/1. Добавили в колбу 980 мл солевого раствора. Диспергирование и стерилизацию осуществляли как указано в примере 6.

Композицию ПФД/ПФОБ получили смешиванием 4 мл ПФД и 16 мл ПФОБ (соотношение компонентов 2/8). К 19 мл полученной смеси ПФС добавили 1 мл ПФМЦП. 20 мл образовавшейся 3-х компонентной смеси прокапывали в гомогенизатор, в который предварительно было залито 980 мл суспензии СФЛ. Процесс диспергирования проводили так как указано в предыдущем примере, розлив и стерилизацию образовавшейся эмульсии осуществляли по стандартной методике.

Состав полученной эмульсии: $C_v = 2$ об. %; соотношение ПФД/ПФОБ составляет 2/8; относительное содержание ПФМЦП равно 5 %; концентрация СФЛ составляет 0,2 вес. %; относительное количество адьюванта — смесь подсолнечного и соевого масел в соотношении 1/1 — равно 1 %. Серия 7.

Пример 8. Для получения эмульсии, содержащей 40 об. % приготавливали суспензию ЯФЛ в концентрации 5 вес.%. Для этого 500 мл спиртового раствора ЯФЛ помещали в круглодонную колбу, отгоняли спирт, вносили в нее 2,5 г касторового

масла в качестве адьюванта, наливали в нее 600 мл солевого раствора, перемешивали и диспергировали на гомогенизаторе при 200 атм до образования однородной среды желтовато-белого цвета. Стерилизовали ее как было указано ранее.

Композицию ПФС готовили смешиванием 40 мл ПФД с 360 мл ПФОБ (соотношение компонентов 1/9). К 360 мл этой композиции добавили 40 мл ПФМЦП. Полученные 400 мл 3-х компонентной смеси ПФС прокапывали в гомогенизатор, где находилось 600 мл полученной ранее суспензии ЯФЛ. Гомогенизацию проводили в два этапа: на первом — при давлении 250 атм, на втором — при давлении 600 атм. Разливали и стерилизовали эмульсию в соответствии с принятой методикой.

Состав полученной эмульсии: $C_v = 40$ об.%; соотношение ПФД/ПФОБ = 1/9; относительное количество добавки ПФМЦП составляет 10 %; концентрация ЯФЛ в эмульсии (в виде суспензии) составляет 5 вес. %; относительное содержание адьюванта — касторового масла — равно 5 %. Серия 8.

Пример 9. Фторуглеродную фазу эмульсии готовили смешиванием 40 мл ПФД с 360 мл ПФОБ. К 320 мл этой композиции добавляли 80 мл смеси, содержащей 40 мл ПФМЦП и 40 мл ПФОЖ. Суспензия эмульгатора содержала 4,2 вес.% ЯФЛ, 4,2 вес.% СФЛ и адьювант — смесь касторового и подсолнечного масел — в соотношении 9/1 в количестве 4,2 г, т. е. 5% от суммарного содержания ЯФЛ.

Для получения эмульсии в гомогенизатор заливали 600 мл полученной суспензии и прокапывали в гомогенизатор 400 мл 3-х компонентной смеси ПФС вышеуказанного состава. Процессы гомогенизации, розлива и стерилизации осуществляли так же, как в предыдущем примере.

Состав эмульсии: $C_v = 40$ об.%; соотношение ПФД/ПФОБ = 1/9; относительное содержание смеси ПФМЦП с ПФОЖ составляет 20%; концентрация ФЛ (смесь ЯФЛ и СФЛ 1:1) в эмульсии 5 вес. %; содержание адьюванта — 0,25% (смесь двух масел касторового и подсолнечного в соотношении 9/1). Серия 9.

Таблица 7

Состав полученных эмульсий ПФС, различных серий (примеры 1–9)

№ се- рии	Сv об. %	Соотноше- ние ПФД/ПФОБ	ПФС добав- ка, относит. содерж.	ФЛ (вес.) %	Вид адьюванта	Адьювант относит. со- держание, %
№ 1	10	9/1	ПФОЖ 20%	ЯФЛ 1%	кастор.	10
№2	10	9/1	ПФОЖ 20%	ЯФЛ 1%	кастор./сои 1/1	10
№3	20	8/2	ПФОЖ 20%	СФЛ 2%	кастор/сои 2/1	15
№4	20	8/2	ПФМЦП 15%	СФЛ 2%	кастор./сои 2/1	15
№5	5	5/5	ПФОЖ 1%	ЯФЛ 0,5 %	подсол.	12
№6	5	5/5	ПФМЦП 1%	СФЛ 0,5%	сои	12
№7	2	2/8	ПФМЦП 5%	СФЛ 0,2%	сои/подсол. 1/1	1
№8	40	1/9	ПФМЦП 10%	ЯФЛ 5%	кастор./подсол. 9/1	5
№9	40	1/9	ПФОЖ 10% ПФМЦП 10%	ЯФЛ 2,5% СФЛ 2,5%	кастор./подсол 9/1	5

В таблице 7. приведен состав всех серий эмульсий.

Далее в табличной форме (табл. 8) приведены результаты наблюдений за изменением среднего диаметра частиц для нативной (неразведенной) и разведенной водой эмульсии в разные ПФС в разные сроки хранения.

Таблица 8.

Значения волнового экспонента и среднего диаметра частиц для исходной и разведенной водой образцов эмульсии ПФУ, полученных по примерам 1,3,4,5,8,9.

№ серии	Сроки хранения, месяцы	n		a , мкм	
		исх.	разв. 1:2	исх.	разв. 1:2
1-01	0	3,40	3,20	0,114	0,13
	1	3,33	3,33	0,119	0,119
	3	3,23	3,20	0,128	0,13
	6	3,27	3,23	0,124	0,128
	9	3,13	3,30	0,136	0,121
	12	3,05	3,14	0,143	0,135
1-03	0	3,27	3,33	0,125	0,119
	1	3,33	3,33	0,119	0,119
	3	3,13	3,20	0,136	0,13
	6	3,20	3,27	0,130	0,124
	12	3,20	3,13	0,130	0,136
1-04	0	3,20	3,13	0,13	0,136
	1	3,17	3,0	0,132	0,148
	3	2,87	3,10	0,165	0,14
	6	3,07	3,10	0,141	0,138
	9	3,10	3,07	0,138	0,141
	12	2,94	2,85	0,155	0,17
1-05	0	3,20	3,27	0,13	0,124
	1	3,13	3,07	0,136	0,14
	3	3,03	3,07	0,146	0,14
	6	3,07	3,03	0,141	0,145
	12	2,97	3,10	0,148	0,138
1-08	0	3,33	3,27	0,113	0,124
	1	3,23	3,26	0,128	0,126
	3	3,10	3,20	0,139	0,13
	6	3,03	3,11	0,14	0,14
	9	2,88	3,10	0,164	0,138
	12	2,87	2,9	0,165	0,160
1-09	0	3,16	3,20	0,134	0,13
	1	3,0	3,13	0,148	0,137
	3	3,0	3,07	0,148	0,141
	6	2,86	3,02	0,182	0,157
	12	2,7	3,07	0,195	0,14

Расчеты n выполнялись по методу наименьших квадратов. Среднеквадратичная ошибка в определении n равнялась 0,01–0,03. Отсюда погрешность в определении n составляет 0,3–1%. Параметр n является характеристической функцией используемого метода спектра мутности и вычисляется не менее, чем по 3–5 точкам. Для тонкодисперсных эмульсий ПФС n однозначно связан со средним диаметром частиц a [14].

Согласно полученным результатам, усредненные параметры n и a практически не менялись в течение 12 месяцев хранения. Разведение водой как стресс-воздействие мало влияло на размер частиц. Несколько большим было увеличение значений a для эмульсий, содержащих СФЛ, в отдаленные сроки наблюдения: 9–12 месяцев. Интервал изменения волнового экспонента в течение 1 года хранения для всех серий эмульсий ПФУ/дисперсия ФЛ находился в пределах 3,4–2,7. Это соответствовало увеличению среднего диаметра частиц с 0,11 до 0,15–0,195 мкм.

Для наблюдения за изменением распределения частиц по размерам использовали прием фракционирования исследуемых сред. Эмульсии центрифугировали в мягких условиях (1500 об/мин) и выделяли (точно) 3 фракции: верхнюю — 20 %, среднюю — 60 %, нижнюю — 20 % от общего объема пробы (рис. 1). Как показано на рис. 1, в эмульсии ПФС, взятой за прототип, помимо трех фракции, различающихся по среднему размеру частиц эмульсии ПФС, имеется верхняя легкая фракция, содержащая свободные фосфолипиды (ФЛс), что свидетельствует о слабой связи адсорбционного слоя с перфторорганической масляной фазой и о наличии не связанных в адсорбционном слое ПАВ. Для каждой фракции находили значения n и a . Величины названных параметров для фракционированных эмульсий заявленного состава при хранении в течение 1–12 месяцев представлены в табл. 9. Оказалось, что n и a для верхней и средней фракций практически не менялись в течение 1–12 месяцев хранения. В нижней фракции отмечено некоторое увеличение размера частиц по мере увеличения срока хранения. Это приводило к увеличению ширины распределения частиц по размерам. При этом максимальная ширина распределения находилась в интервале 0,06–0,19 мкм.

Полученные нами результаты показали, что в течение 12 месяцев хранения средний диаметр частиц для нативных эмульсий и при разведении их водой (стресс-воздействие) увеличивался незначительно, оставаясь в допустимых пределах: менее 0,20 мкм.

Таблица 9.

Параметры n и a , характеризующие ширину распределения частиц по размерам для эмульсий ПФУ по примерам 1,3,4,5,8,9 в течение 12 месяцев хранения (верх., осн., нижн. — фракции, определяемые после центрифугирования)

№ се-рии	t , меся-цы	разве-дение	n			a , мкм		
			верхн.	осн.	нижн.	верхн.	осн.	нижн.
1-01	0	б/р	3,50	3,27	3,27	0,105	0,119	0,124
		1:2	3,87	3,39	2,93	0,05	0,114	0,157
	1	б/р	3,47	3,27	3,0	0,107	0,124	0,148
		1:2	3,57	3,43	3,13	0,095	0,111	0,136
	3	б/р	3,43	3,33	2,93	0,11	0,119	0,157
		1:2	3,83	3,30	3,23	0,062	0,121	0,128
	6	б/р	3,47	3,27	3,0	0,106	0,124	0,148
		1:2	3,9	3,4	3,13	0,044	0,114	0,136
	12	б/р	3,47	3,27	2,78	0,107	0,124	0,185
		1:2	3,6	3,33	2,93	0,09	0,119	0,156
1-03	0	б/р	3,37	2,87	2,83	0,118	0,165	0,175
		1:2	3,47	3,47	3,17	0,108	0,108	0,133
	1	б/р	3,4	3,08	2,8	0,114	0,141	0,183
		1:2	3,6	3,26	3,20	0,09	0,125	0,13
	3	б/р	3,33	3,23	2,87	0,119	0,128	0,165
		1:2	3,50	3,33	3,03	0,104	0,119	0,146
	6	б/р	3,53	3,33	3,10	0,101	0,119	0,139
		1:2	3,5	3,33	3,13	0,104	0,119	0,136
	12	б/р	3,53	3,27	2,93	0,10	0,124	0,157
		1:2	3,6	3,4	3,0	0,09	0,114	0,148
1-04	0	б/р	3,33	3,07	3,07	0,119	0,141	0,141
		1:2	3,3	3,17	3,13	0,121	0,131	0,136
	1	б/р	3,2	3,13	2,93	0,13	0,136	0,157
		1:2	3,33	3,23	3,03	0,119	0,128	0,145
	3	б/р	3,27	3,03	2,74	0,124	0,146	0,195
		1:2	3,3	3,2	2,8	0,121	0,13	0,182
	6	б/р	3,33	3,17	2,76	0,119	0,132	0,195
		1:2	3,50	3,20	2,93	0,104	0,13	0,157
	12	б/р	3,17	3,07	2,8	0,132	0,141	0,182
		1:2	3,33	3,20	2,93	0,119	0,13	0,157

Продолжение таблицы 9

№ се- рии	t, месяцы	разве- дение	n			a, мкм		
			верхн.	осн.	нижн.	верхн.	осн.	нижн.
1-05	0	б/р	3,0	3,23	2,93	0,148	0,128	0,157
		1:2	3,60	3,33	3,06	0,09	0,119	0,141
	1	б/р	3,33	3,17	2,9	0,119	0,132	0,162
		1:2	3,47	3,27	3,07	0,106	0,124	0,141
	3	б/р	3,23	3,13	2,87	0,127	0,136	0,166
		1:2	3,23	3,29	3,03	0,127	0,122	0,146
	6	б/р	3,37	3,17	2,73	0,116	0,132	0,195
		1:2	3,53	3,23	2,97	0,101	0,128	0,151
	12	б/р	3,23	3,07	2,72	0,128	0,141	0,198
		1:2	3,57	3,2	2,93	0,095	0,13	0,157
1-08	0	б/р	3,40	3,37	3,27	0,114	0,116	0,124
		1:2	3,40	3,40	3,20	0,114	0,114	0,13
	1	б/р	3,37	3,30	3,17	0,116	0,122	0,132
		1:2	3,30	3,20	2,90	0,122	0,130	0,161
	3	б/р	3,33	3,17	2,93	0,119	0,132	0,158
		1:2	3,47	3,40	2,83	0,106	0,114	0,175
	6	б/р	3,20	3,06	2,81	0,13	0,151	0,181
		1:2	3,37	3,14	2,73	0,124	0,165	0,196
	12	б/р	3,08	2,97	2,72	0,14	0,15	0,198
		1:2	3,52	3,16	2,99	0,10	0,13	0,15
1-09	0	б/р	3,27	3,13	2,87	0,124	0,136	0,167
		1:2	3,27	3,30	2,83	0,125	0,122	0,175
	1	б/р	3,03	3,0	2,77	0,146	0,149	0,188
		1:2	3,30	3,03	2,93	0,122	0,139	0,157
	3	б/р	3,13	3,07	2,73	0,136	0,141	0,196
		1:2	3,17	3,10	3,0	0,132	0,138	0,148
	6	б/р	3,11	3,01	2,78	0,147	0,156	0,185
		1:2	3,40	3,17	2,34	0,124	0,136	0,162
	12	б/р	3,08	2,91	2,78	0,14	0,16	0,185
		1:2	3,33	3,15	2,81	0,12	0,135	0,18

Обнаруженное увеличение было связано с увеличением ширины распределения частиц по размерам за счет появления в эмульсиях относительно крупных частиц. Так, при фракционировании эмульсий после 12 месяцев хранения размер частиц в нижней фракции возрастал с 0,12 до 0,198 мкм. В целом эти результаты соответствуют основному механизму разрушения эмульсий по Оствальду (или молеку-

лярной перегонке). Однако доля таких относительно крупных частиц была настолько мала (~10%), что это обстоятельство не сказывалось на увеличении среднего диаметра частиц. Следует подчеркнуть, что при фракционировании эмульсий отмечалось только равномерное оседание частиц, что говорило об отсутствии в эмульсиях свободных ФЛ даже спустя 1 год хранения, т. е. характер распределения частиц в эмульсиях не менялся, оставаясь мономодальным. Полученные результаты свидетельствуют о сохранении общей структуры полученных нами эмульсий ПФУ в течение 1–12 месяцев хранения.

В табл. 10 приведены значения индексов взаимодействия K_r частиц исследованных эмульсий с сывороткой крови, модифицированной добавлением 5%-ного раствора альбумина в соотношении 1/1.

Индексы взаимодействия эмульсий ПФУ с сывороткой крови K_r , которые характеризуют их микроструктуру, для эмульсий ПФУ/ЯФЛ в течение 12-месячного срока наблюдений колебались в некотором достаточно узком интервале (соотношение сыворотка : эмульсия = 1 : 0,05 и 1 : 0,1). При увеличении соотношения сыворотка : эмульсия до 1 : 0,10 интервал колебания индексов K_r и $K_{r/n}$ возрастал. Для эмульсий ПФУ/СФЛ узкий интервал колебаний K_r сохранялся только до 6-месячного срока хранения. Как уже было отмечено, установленные нами колебания K_r связаны, скорее всего, с тем, что стандартизовать смесь сывороток от опыта к опыту при различных сроках хранения эмульсий весьма сложно. Вместе с тем сохранение интервала колебаний индекса взаимодействия эмульсий с сывороткой крови в определенных и достаточно узких пределах для каждой серии свидетельствует о том, что поверхностные свойства частиц при столь длительных сроках хранения (6–9 мес.) меняются мало. Скачок K_r к концу срока хранения при отсутствии в эмульсиях свободных ФЛ может быть связан с возникновением дополнительных взаимодействий между частицами и макромолекулами сыворотки. Для проверки этого предположения нами были рассчитаны экспериментальные и расчетные значения мутности τ — дополнительного независимого параметра оценки целостности структуры эмульсий ПФУ (табл. 11) [13].

Таблица 10.

Значения индексов взаимодействия с сывороткой крови эмульсий ПФУ разных сроков хранения при +4°C

№ се- рии	Срок хранения	τ		K _τ	
		Соотношение сыворотка : эмульсия			
		1 : 0,05	1 : 0,1	1 : 0,05	1 : 0,1
1-02	0	0,8±0,1	1,33±0,03	3,8±0,5	6,2±0,2
	1	0,93±0,06	1,4±0,1	4,9±0,3	7,2±0,5
	3	0,97±0,02	1,99±0,003	3,50±0,07	5,01±0,02
	6	0,97±0,01	1,63±0,03	3,5±0,4	3,4±0,1
	9	1,23±0,02	2,09±0,03	3,7±0,2	7,0±0,1
	12	1,7	2,32±0,01	7,2±0,3	10,09±0,1
1-03	0	0,77±0,07	1,1±0,1	3,3±0,3	4,8±0,4
	1	0,84±0,05	1,29±0,06	4,0±0,3	6,6±0,3
	3	1,0±0,1	1,46±0,05	3,6±0,6	5,28±0
	6	0,92±0	1,53±0	3,3±0,4	3,19±0,03
	12	1,33±0	1,92±0	4,0±0,2	6,4±0
1-04	0	1,00±0,06	1,25±0,08	5,4±0,3	5,4±0,4
	1	1,1±0,2	1,67±0,03	5,3±0,9	8,9±0,2
	3	1,15±0	1,84±0,06	4,4±0,3	3,83±0,06
	6	1,18±0,02	1,97±0,03	5,7±0,8	10,7±0,2
	9	1,83±0,04	1,76±0,02	4,2±0,4	4,40±0,04
	12	1,30±0,04	2,22±0,07	7,7±0,5	13,9±0,8
1-05	0	0,98±0,05	1,56±0,08	5,1±0,2	8,0±0,4
	1	1,1±0,1	1,76±0,02	4,3±0,6	7,0±0,1
	3	1,1±0,3	1,90±0,06	4,5±0,8	8,3±0,2
	6	1,18±0,02	2,05±0,07	5,7±0,8	11,1±0,4
	12	1,60±0,01	2,91±0,05	3,6±0,3	7,2±0,1
1-08	0	0,77±0,05	1,15±0	3,4±0,4	5,4±0,7
	1	0,95±0,02	1,43±0,03	4,0±1,0	6,4±0,3
	3	1,10±0,1	1,57±0,02	5±1	8,7±0,5
	6	1,4±0,1	1,94±0,03	3,3±0,6	5,4±0,5
	9	1,52±0,03	2,68±0,05	10±2	19±1
	12	1,38±0,08	2,30±0,03	11±2	21,3±0,9
1-09	0	0,81±0,02	1,48±0,03	5,6±0,6	14,5±0,3
	1	1,2±0,1	1,8±0	6±1	4,79±0,07
	3	1,2±0	1,4±0,4	6,0±0,5	7±3
	6	1,2±0,2	2,25±0,03	2,8±0,5	6,4±0,5
	9	1,9±0,1	3,24±0,03	14±2	24±2
	12	1,52±0,03	2,68±0	12±1	25,3±0,7

По физическому смыслу τ для дисперсных систем является суммой потерь мощности светового пучка на отдельных частицах в случае отсутствия кооперативных эффектов и многократного рассеяния. Совпадение экспериментальных и расчетных значений τ как для нативных, так и для разведенных водой эмульсий свидетельствовало о том, что взаимодействие между частицами и макромолекулами сыворотки практически не меняется даже спустя 9–12 месяцев хранения при +4 °С. Скачок K_{τ} , скорее всего, связан с появлением в водной дисперсионной среде дополнительных надмолекулярных структур ПФУ/ФЛ, причем соотношение в них ПФУ и ФЛ остается таким же, что и в эмульсиях.

Таблица 11.

Экспериментальные и расчетные значения мутности для эмульсий при различных сроках хранения

№ серии, (объемное содержа- ние ПФС)	Срок хранения, мес.	τ_{500}			
		Исходная		разведенная 1 : 2	
		эксп.	расчет	эксп.	Расчет
1-01 (10 об.%)	0	9,9	10,0	4,6	4,7
	1	11,7	11,6	3,60	3,75
	3	12,2	12,0	3,91	4,02
	6	13,8	13,1	4,1	3,86
	9	13,8	14,0	4,29	4,37
	12	16,1	14,1	4,98	4,94
1-03 (20 об.%)	0	8,23	9,06	3,60	3,65
	1	9,66	10,2	3,07	3,11
	3	12,4	11,3	3,3	3,39
	6	13,3	11,55	3,57	3,57
	12	13,1	12,4	4,02	4,02
1-04 (20 об.%)	0	12,3	11,4	4,05	4,0
	1	13,8	13,2	4,6	4,5
	3	21,0	15,4	4,98	5,0
	6	16,1	15,5	5,5	5,5
	9	17,2	17,2	5,6	6,2
	12	20,9	19,9	6,8	6,5

продолжение табл. 11

№ серин, (объемное содержа- ние ПФС)	Срок хранения, мес.	τ_{500}			
		Исходная		разведенная 1 : 2	
		эксп.	расчет	эксп.	Расчет
1-05 (5 об.%)	0	12,88	13,11	4,22	4,38
	1	14,03	13,25	4,68	4,71
	3	19,1	16,9	5,6	5,56
	6	16,8	16,15	5,3	5,3
	12	18,9	18,5	5,4	4,5
1-08 (40 об.%)	0	8,97	8,74	2,91	2,81
	1	11,7	11,6	3,53	3,47
	3	13,8	13,6	4,14	4,0
	6	16,6	15,4	4,68	4,59
	9	21,8	18,9	5,6	5,6
	12	21,2	19,7	6,2	6,2
1-09 (40 об.%)	0	14,03	14,44	4,29	4,15
	1	19,3	17,5	5,75	5,61
	3	19,09	18,72	5,52	5,34
	6	21,8	18,2	6,13	8,71
	9	26,2	23,9	7,7	7,8
	12	26,9	25,5	4,91	4,3

Прежде чем говорить о преимуществах заявленного состава и способа получения эмульсий ПФС, следует подчеркнуть, что главными условиями выполнения эмульсиями ПФС газотранспортной функции при циркуляции в сосудистом русле является сохранение корпускулярной природы частиц и отсутствие реактогенности. С позиции коллоидной химии и биофизики попадание эмульсии ПФУ в сосудистое русло можно рассматривать как стресс-воздействие, которое должно приводить к изменению свойств дисперсной среды. Это воздействие можно свести к следующим моментам. Разбавление эмульсии ПФУ и уменьшение концентрации свободного эмульгатора в среде (быстрая стадия). В результате этого процесса проис-

ходит ослабление связей молекул ПАВ с поверхностью частиц (замедленная стадия). Это изменение прочности связей ПАВ с ПФУ усугубляется контактом и взаимодействием частиц с макромолекулами плазмы, что может привести к изменению состава адсорбционного слоя или разрушению частиц. Обозначенная последовательность процессов представляет собой несколько упрощенную схему.

В наших опытах разведение эмульсий водой моделирует первую стадию — разбавление эмульсии и уменьшение концентрации свободного эмульгатора вокруг частиц. Изучение взаимодействия полученных эмульсий с сывороткой крови моделирует вторую стадию — влияние контакта макромолекул сыворотки на свойства поверхности частиц. Оказалось, что даже спустя год хранения частицы эмульсий ПФУ сохраняют свою «микроструктуру»: разбавление эмульсий водой не влияло на размер частиц, что свидетельствовало о прочности связи адсорбционного слоя ПАВ с ядром частиц — ПФС; не менялся также индекс взаимодействия частиц эмульсий с сывороткой крови (в пределах погрешности измерений), что свидетельствовало о сохранении поверхностных свойств частиц. Совпадали расчетные значения τ (после фракционирования) с экспериментальными (до фракционирования), что подтверждает сохранение «природы» частиц (их структуры) и свидетельствует об отсутствии свободных ФЛ в эмульсиях спустя 1 год хранения.

Использованные нами методологические подходы значительно увеличивают достоверность прогноза стабильности эмульсий при попадании в сосудистое русло. Подтверждением сказанному являются результаты параллельных исследований по изучению стабильности и определению индекса реактогенности (I_p) нескольких серий эмульсий идентичного состава. I_p находили по методу [3].

Пример 10. Было получено 4 серии однотипных эмульсий состава, соответствующего примеру 2: содержание фторуглеродной основы составило 9 ± 1 об. %, соотношение ПФД/ПФОБ 9:1; добавка ПФОЖ составляла 20%; содержание ЯФЛ равнялось 1 вес.%; количество адъюванта — касторового масла и соевого масла в соотношении 1:1 составляло 8 % от концентрации ЯФЛ.

В таблице 12 приведены значения n и a для этих серий разных сроков хранения.

Таблица 12

Значения волнового экспонента n и среднего диаметра частиц a для эмульсий одинакового состава ПФД/ПФОБ/ПФОЖ/ЯФЛ разных сроков хранения

№ серии	Срок хранения (мес)	n	a , мкм	n	a , мкм
		исходная		разведенная	
5-03	0	$3,70 \pm 0,03$	0,08	$3,81 \pm 0,07$	0,06(5)
	1	$3,62 \pm 0,03$	0,09	$3,83 \pm 0,05$	0,06(5)
	6	$3,80 \pm 0,04$	0,07	$3,76 \pm 0,06$	0,07(5)
5-04	0	$3,36 \pm 0,02$	0,117	$3,58 \pm 0,01$	0,09
	1	$3,30 \pm 0,04$	0,122	$3,53 \pm 0,05$	0,10(1)
	6	$3,37 \pm 0,05$	0,117	$3,08 \pm 0,08$	0,14
5-05	0	$3,35 \pm 0,05$	0,116	$3,47 \pm 0,04$	0,11
	1	$3,07 \pm 0,07$	0,141	$3,24 \pm 0,09$	0,12(7)
	6	$3,37 \pm 0,03$	0,117	$3,13 \pm 0,02$	0,13(6)
5-06	0	$3,32 \pm 0,02$	0,12	$3,35 \pm 0,05$	0,11(6)
	1	$3,07 \pm 0,07$	0,141	$3,09 \pm 0,08$	0,139
	6	$3,45 \pm 0,04$	0,108	$3,26 \pm 0,09$	0,12(5)

Таблица 13

Значение волнового экспонента n и среднего диаметра частиц a , характеризующих ширину распределения частиц по размерам, при фракционировании методом центрифугирования для эмульсий одинакового состава ПФД/ПФОБ/ПФОЖ/ЯФЛ

№ серии	Срок хранения (мес.)	разведение водой	n			a мкм		
			верх	Осн.	Нижн.	Верх.	Осн.	Нижн.
5-04	0	нативная	3,53	3,47	3,21	0,10	0,11	0,13
		1/2	3,77	3,63	3,27	0,07	0,09	0,124
	1	нативная	3,53	3,51	3,19	0,101	0,104	0,132
		1/2	3,85	3,66	3,26	0,06	0,085	0,125
	6	нативная	3,61	3,46	3,15	0,089	0,109	0,135
		1/2	3,61	3,12	2,9	0,089	0,136	0,160
5-05	0	нативная	3,71	3,43	3,17	0,079	0,110	0,132
		1/2	3,88	3,67	3,31	0,055	0,084	0,120
	1	нативная	3,60	3,30	3,05	0,094	0,122	0,145
		1/2	3,72	3,35	2,78	0,078	0,122	0,184
	6	нативная	3,56	3,34	2,90	0,098	0,118	0,162
		1/2	3,53	3,15	2,71	0,101	0,135	0,20

Согласно полученным данным средний диаметр частиц во всех случаях для нативной и разведенной водой эмульсии не менялся в течение 6 месяцев хранения, оставаясь в пределах 0,06–0,17 мкм. Ширина распределения частиц по размерам для нативной и разведенной водой эмульсий названного состава практически не менялась в указанный период наблюдений (табл. 13). Индекс взаимодействия полученных эмульсий с модифицированной сывороткой крови K_t с учетом относительной погрешности измерения ($\pm 10\%$) колебался в достаточно узких пределах (табл. 14).

Таблица 14

Значения индекса взаимодействия K_t эмульсий одинакового состава ПФД/ПФОВ/ПФОЖ/ЯФЛ с модифицированной сывороткой крови в присутствии альбумина (80%).

Номер серии	Срок хранения (мес)	Соотношение сыворотка/эмульсия	
		1 : 0,05	1 : 0,1
5-03	0	2,28	3,37
	1	2,34	3,70
	6	2,60	4,00
5-04	0	3,76	6,00
	1	3,63	5,62
	6	4,05	6,03
5-05	0	4,0	5,56
	1	4,33	6,06
	6	4,53	6,1

Таблица 15

Величины индекса реактогенности эмульсий одинакового состава ПФД/ПФОВ/ПФОЖ/ЯФЛ (в качестве контроля взята дисперсия ФЛ).

Номер серии	Длительность хранения (месяцы)		
	0	1	6
Дисперсия ФЛ	1,4	—	—
5-03	2,83	1,68	1,92
5-04	1,14	2,14	2,24
5-05	1,83	1,83	1,70
5-06	2,42	1,35	2,63

Приведенные результаты свидетельствует о том, что в предлагаемых эмульсиях и способе их получения удастся достигнуть высокого качества микроструктуры эмульсий, не повреждаемой при хранении в не замороженном виде и последующих стрессовых воздействиях *in vitro* (разведение водой, взаимодействие с сывороткой крови, обогащенной альбумином). Результаты проверки реактогенности тех же образцов эмульсий полностью подтверждают данные модельных исследований: ни в один из сроков исследования индекс реактогенности не превысил критической величины, равной 3 (табл. 15).

Пример 11. Сохранность структуры и анализ уровня реактогенности эмульсий с пониженным объемным содержанием ПФС на уровне 5 об.%. Состав эмульсии ПФД/ПФОВ 1:1, ПФМЦП 1%, СФЛ — 0,5 %, адъювант масло сои — 12 %. Ширина распределения размеров частиц находилась в диапазоне 0,03 до 0,12 мкм, исходный индекс реактогенности составлял 1,61. Исследовались изменения при хранении среднего размера частиц нативных и разведенных водой четырех однотипных эмульсий (табл. 16) и реактогенность после 6 месяцев хранения (табл. 17). Как следует из приведенных данных, наблюдаемое приращение размера частиц при использовании рецептуре и предложенном нами способе получения обеспечивают сохранение низкого уровня индекса реактогенности.

Таблица 16

Значение волнового экспонента n и среднего диаметра частиц a для нативных и разведенных водой эмульсий одинакового состава ПФД/ПФОВ/ПФМЦП/СФЛ

Номер серии	Срок хранения, месяцы	n	a мкм	n	a мкм
		исходная		разведенная водой 1:2	
6 — 02	1	3,27±0,04	0,122	3,29±0,03	0,123
	6	3,08±0,09	0,138	3,18±0,02	0,132
6 — 03	1	3,19±0,01	0,13	3,28±0,02	0,124
	6	3,06±0,01	0,145	3,11±0,03	0,138
6 — 05	1	3,31±0,01	0,12	3,48±0,01	0,105
	6	3,24±0,01	0,126	3,39±0,01	0,114
6 — 06	1	3,11±0,03	0,137	3,23±0,03	0,128

Таблица 17

Величины индекса реактогенности I_p для эмульсий с низким содержанием ПФС через 6 месяцев хранения в незамороженном состоянии

Серия эмульсии	6 — 02	6 — 03	6 — 05	6 — 06
Индекс реактогенности	1,87	2,00	1,36	1,8

Пример 12. Длительное в течение 18 месяцев хранение эмульсии, содержащей 10 об.% ПФС, при соотношении ПФД/ПФОБ 8 : 2, ПФОЖ 20%, ЯФЛ 2%, адъювант касторовое масло 10%. Результаты исследования изменения среднего размера частиц при хранении и разведении эмульсии водой представлены в табл. 18, динамика индекса взаимодействия эмульсии с сывороткой крови, обогащенной альбумином до 50% — в табл. 19.

Таблица 18

Значение волнового экспонента n и среднего диаметра частиц a для нативной и разведенной водой эмульсий ПФД/ПФОБ/ПФОЖ/ЯФЛ в разные сроки хранения в не замороженном виде.

Номер серии	Срок хранения, месяцы	n	a мкм	n	a мкм
		исходная		разведенная водой 1:2	
7 — 03	0	3,70±0,03	0,08	3,81±0,07	0,065
	1	3,62±0,03	0,09	3,83±0,05	0,065
	6	3,80±0,04	0,07	3,76±0,06	0,07
	18	3,81±0,04	0,065	3,77±0,06	0,07

Таблица 19

Значения индекса взаимодействия K_t эмульсии ПФД/ПФОБ/ПФОЖ/ЯФЛ с сывороткой крови в присутствии альбумина (50%) в разные сроки хранения.

Номер серии	Срок хранения, месяцы	K_t	
		Соотношение сыворотка /эмульсия	
		1 : 0,05	1 : 0,1
7 — 03	0	1,74	2,37
	1	1,68	2,25
	6	1,48	2,74
	18	1,22	1,78

Как видно из приведенных данных, полученная эмульсия сохраняла измеряемые физико-химические характеристики. Очевидно, благодаря этому через 18 мес. хранения индекс реактогенности I_r для эмульсии ПФД/ПФ ОБ/ПФ ОЖ/ЯФЛ составлял всего 1,5.

Пример 13. Сопоставление качества эмульсий ПФС, полученных по прототипу, эмульсии Оксигент AF 0104 (фирмы Alliance Therapeutic, США) и эмульсии ПФС, полученной предлагаемым в настоящем изобретении способом. Сравнение проводилось по изменению волнового экспонента и среднего диаметра частиц при разведении водой.

В сравниваемых эмульсиях при разном абсолютном содержании ПФС соблюдено равное соотношение компонентов ПФС/ФЛ. Указанные эмульсии отличаются по способу получения. В результате эмульсия ПФ ОБ-2 (полученная по заявляемому способу) не содержит после центрифугирования свободной фосфолипидной фазы (рис. 1Б), тогда как эмульсия Оксигент и эмульсия прототип ПФ ОБ-1 содержит не связанные в адсорбционном слое частиц свободные фосфолипиды, легко всплывающие при центрифугировании (рис. 1А). Именно поэтому при разведении эмульсий водой, когда происходит разрушение агрегатов ФЛ и частиц эмульсий происходило «уменьшение» среднего размера частиц эмульсии в препарате Оксигент с 0,35 до 0,15.

В эмульсии прототипа (ПФ ОБ-1), очевидно, отсутствовали такие грубые агрегаты, но об их присутствии свидетельствуют, помимо результатов центрифугирования и выделения фракции свободных ФЛ, резкие различия между расчетными и экспериментально определенными параметрами значений мутности, определяемыми по правилам аддитивности, для нативных и разведенных водой эмульсий. Тогда, как для препаратов эмульсий ПФС, полученных заявленным способом, наблюдалось практически полное соответствие по параметру мутности между экспериментальными и расчетными значениями (таблица 21). Следует отметить, что по

физическому смыслу определяемый параметр отражает сумму потерь мощности светового пучка на отдельных частицах в отсутствии кооперативных эффектов и многократного рассеяния. Несоответствие экспериментальных и расчетных значений мутности для препарата Оксигент и эмульсии ПФОБ-1 (прототип) свидетельствовало о несоблюдении правила аддитивности для этих сред, т. е. о наличии в названных дисперсных системах дополнительных взаимодействий между частицами и световым потоком. Эти взаимодействия отчетливо выявляются при разведении водой препарата Оксигент и эмульсий ПФОБ-1, что отражает неоднородность вида частиц, в частности наличие наряду с частицами эмульсии ПФС различных мицеллярных структур ФЛ. Для эмульсии ПФОБ-2 и эмульсии ПФД/ПФОБ (серия 5-03) взаимодействия между частицами и световым потоком подчинялись правилу аддитивности даже спустя месяц хранения в незамороженном состоянии.

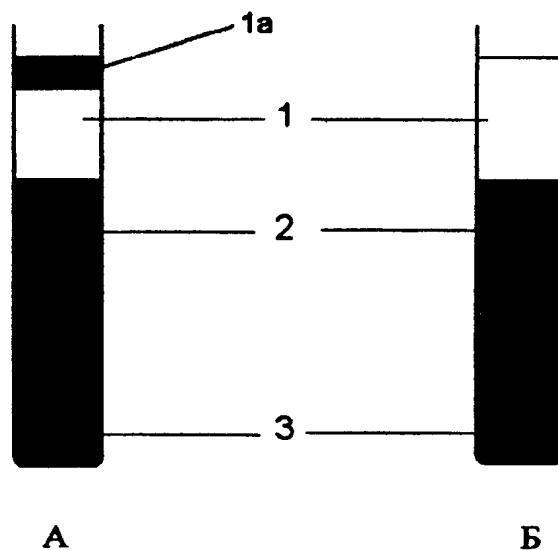


Рис. 1. Схема разделения эмульсий ПФС по фракциям в зависимости от способа получения: А — по прототипу (эмульсия содержит свободные ФЛ); Б — по предлагаемому способу эмульсия содержит лишь различные по размерам частицы). 1, 2, 3 — верхняя, основная и нижняя фракции. 1а — свободные ФЛ в верхней фракции

Таблица 20

Состав различных эмульсий ПФС, значения волнового экспонента n и среднего диаметра частиц a для нативных и разведенных водой эмульсий (1:1).

Препарат, вид ПФС	Состав		n		a , мкм	
	<u>ПФС,</u> <u>масс./</u> <u>объем</u>	ФЛ, масс. %	исход- ный	разве- дение H ₂ O 1 : 1	исходный	разве- дение H ₂ O 1 : 1
Оксигент AF 0104 (ПФОВ)	90 вес % 45 об%	4	2,34 ±0,04	2,93 ±0,10	0,35	0,15
Эмульсия ПФОВ-1 (прототип)	45 вес % 22 об%	2	2,91 ±0,09	2,82 ±0,10	0,16	0,18
Эмульсия по предлага- емому способу (со- став по прототипу ПФОВ-2)	20 % 10 об%	1	3,38±0, 02	3,33±0, 05	0,114	0,115

Таблица 21

Степень соответствия экспериментальных (опыт) значений мутности с расчетными значениями этого параметра (расчет), определяемыми по правилу аддитивности для разных эмульсий.

Препарат	Нативная		Разведенная водой 1:1	
	опыт	расчет	опыт	расчет
Оксигент	133,9±1,0	33,2	59,3±0,5	23
ПФОВ-1 (прототип)	26,6±0,3	18,6	16,4±0,2	5,21
ПФОВ-2 (заявлен- ный способ)	9,3	10,0	2,35	2,31
ПФД/ПФОВ 9:1 (за- являемые состав и способ, пример 10)	12,9	11,2	3,24	3,17

Таким образом, приведенные примеры свидетельствуют о целом комплексе преимуществ описанного состава и способа получения заявленной эмульсии по сравнению с прототипом и аналогами. Это обусловлено благодаря следующим синергически взаимодействующим факторам.

1. ПФД и ПФОБ взяты в качестве основных компонентов потому, что именно эти ПФС проверены по своим биологическим и физико-химическим свойствам как биологически приемлемые, обладающие высокой скоростью выведения из организма, т. е. из клеток ретикуло-эндотелиальной системы, аккумулирующих частицы ПФС.

2. Совместное использование ПФД и ПФОБ в эффективном соотношении формирует смешанную масляную фазу, свойства которой меняются градуально от центра к периферии таким образом, что позволяет использовать в рецептуре мало липофильные и негидрофильные перфторированные третичные амины, которые имеют существенно меньшее давление пара (см. табл. 1) и уменьшают тем самым скорость диффузионного проникновения липофильных молекул ПФД и ПФОБ в водную фазу. Это обстоятельство замедляет скорость основного механизма разрушения эмульсий — «созревание по Оствальду» — и увеличивает стабильность выбранного состава эмульсий ПФС.

3. Введение ПФОБ в состав эмульсий увеличивает их кислородную емкость при том же содержании ПФС и придает им дополнительные рентгеноконтрастные свойства.

4. Наличие в составе композиции ПФОБ/ПФД и смеси перфторированных третичных аминов способствует снижению вязкости конечной формы благодаря более прочному связыванию адсорбционного слоя ПАВ вокруг частиц, что позволяет полностью исключить содержание свободных мицеллярных форм ФЛ в водной фазе эмульсий.

5. Использование наряду с фосфолипидами различных по физико-химическим характеристикам масел способствует формированию более плотного мембраноподобного адсорбционного слоя вокруг частиц при меньшем количестве фосфолипидов, предотвращает образование мицеллярных, не содержащих ПФС структур.

6. Особенности использованной водно-солевой среды обеспечивают сохранение на поверхности частиц отрицательного заряда, что препятствует их слипанию при хранении и транспортировке.

7. Наряду с технологическими приемами, обеспечивающими получение высококалиброванной (с узким распределением размеров частиц) эмульсии, вышеука-

занные приемы ослабляют процесс молекулярной перегонки ПФС и также способствуют более высокой сохранности эмульсий.

8. Отсутствие агрегатов частиц и мицеллярных форм ФЛ обеспечивает уменьшение адсорбционных и комплемент активирующих свойств эмульсии при попадании ее в кровоток, что обуславливает низкий уровень реактогенности и способствует повышению биосовместимости эмульсий предложенного состава.

III. Ниже приведены эксперименты биомедицинского использования предложенных эмульсий.

Эксперимент 1. Использование эмульсии ПФС для массивного кровезамещения. Здоровым крысам породы Wistar массой 250–300 г ($n=20$) под нембуталовым наркозом проводили изоволюмическое кровезамещение эмульсией ПФС, приготовленной согласно примеру 1 (разд. II). Определяли выживаемость крыс после массивного кровезамещения и сохранность митохондрий печени после возмещения кровопотери (метод см. [16]). Для обеспечения поддержания онкотического давления после массивного кровезамещения эмульсию ПФС смешивали перед инфузией животному с 20% раствором человеческого альбумина в соотношении 1 часть раствора 20% альбумина и 6 частей эмульсии ПФС так, чтобы конечная концентрация альбумина составляла 3,5% (с учетом того, что 10 объемных процентов эмульсии составляют ПФС). Во время операции кровезамещения крысы дышали воздухом, обогащенным кислородом с величиной FiO_2 0,5, подаваемым под прозрачный колпак из оргстекла, которым накрывалась голова фиксированного на спине животного. Из венозного синуса (правого предсердия) забирали шприцом 3,5 мл крови и вводили 3,5 мл эмульсии ПФС. Через 10 минут вновь забирали 3,5 мл крови и вводили равное количество эмульсии ПФС. Затем вновь повторяли процедуру кровезамещения так, чтобы конечный объем взятой крови составлял в среднем не менее 3,5% от массы тела животного, например, у животного массой 250 г объем забираемой крови и объем вводимой эмульсии ПФС составляли по 8,8 мл. До и после

кровезамещения определяли содержание гемоглобина в периферической крови, парциальное давление кислорода и pH в артериальной и венозной крови. В этой серии экспериментов концентрация гемоглобина снижалась после кровезамещения в среднем 1,9 раза. В контрольной группе ($n=20$) животным вместо эмульсии ПФС вводили 0,15 М раствор хлорида натрия, содержащий 3,5 % альбумина. С помощью ЯМР-спектрометра определяли у животных содержание ПФС в периферической крови. После операции кровезамещения животные в течение 5 дней содержались в специальной камере с подачей воздуха, обогащенного кислородом при FiO_2 0,5.

В опытной группе (кровезамещение эмульсией ПФС) все животные выжили и содержание гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов восстановилось в течение 5 дней. В контрольной группе 3 животных погибло. Через 5 суток всех выживших животных забивали под нембуталовым наркозом и из ткани печени выделяли митохондрии. Дыхание митохондрий печени регистрировали полярографически в закрытой термостатируемой ячейке при 27 °С. Было обнаружено, что в контрольной группе скорость дыхания в активном состоянии (при синтезе АТФ) и собственно скорость синтеза АТФ при окислении НАД-зависимого субстрата 3-гидроксипиридат снижаются в среднем в 1,5 раза, при 20% активации окисления сукцината. Эти данные свидетельствуют о перенесенном животными умеренном ишемическом поражении ткани печени. Тогда, как в митохондриях печени, выделенных у животных через 5 дней после возмещения кровопотери эмульсией ПФС, наблюдалась активация всех скоростей дыхания и синтеза АТФ в среднем на 25%, что свидетельствовало о наличии в анамнезе лишь умеренной гипоксии.

Эксперимент 2. Все процедуры проводили также, как в предыдущем примере, но использовали эмульсию, содержащую 20 об.% ПФС, и содержание гемоглобина снижали в 3 раза по сравнению с исходным, замещая в среднем 65–70 % объема циркулирующей крови. Объем взятой крови и введенного кровезамещающего со-

става составлял по 12,25 мл для животного массой 250 г. В результате в опытной группе выжили все животные, в контрольной погибло 5 животных.

Эксперимент 3. Все процедуры проводили так же, как в примере 1, за исключением того, что по 5 животных в каждой группе забивали через 6 часов, 1 сутки и 3 суток после кровезамещения. Выделяли митохондрии из печени и регистрировали параметры фосфорилирующего дыхания. У животных контрольной группы во все указанные сроки наблюдалось резкое подавление скоростей дыхания и фосфорилирования при окислении как НАД-зависимых субстратов, так и сукцината в среднем более, чем на 50%, что характерно для тяжелого ишемического повреждения митохондрий. В опытной группе через 6 часов после кровезамещения наблюдалось 40% активация фосфорилирующего дыхания, которая сохранялась через сутки и составляла не более 25% через 3 суток после кровезамещения эмульсией ПФС. Такие сдвиги характерны для сохраненных митохондрий печени животных, перенесших гипоксию, но не ишемию.

Эксперимент 4. Сохранение почек у собак, перенесших геморрагический шок. Сохранность почек определялась по восстановлению функции почек после пересадки животному реципиенту с обеими удаленными почками (исследование проводилось по специальному разрешению этической комитета Минздрава), а также по результатам оценки состояния уровня адениловых нуклеотидов и содержанию лактата и пирувата в ткани почки через час после возмещения кровопотери. Исследование выполнено на 10 собаках, по 5 собак в каждой группе.

Ход исследования. У интубированной собаки массой 20 кг, находящейся под общим ингаляционным наркозом с управляемым дыханием, из бедренной артерии струйно забирается 400 мл крови, что сопровождается резким падением артериального давления (до 50–60 мм рт.ст), двукратным увеличением частоты сердечных сокращений, увеличением концентрации лактата в плазме крови до 20 мМ. Через час после взятия крови животному вводили кровезаменитель в дозе, превышающей

объем кровопотери на 15%: в опытной группе — эмульсию, содержащую 10 об% ПФС по примеру 1 с добавлением альбумина до 3,5% (как в примере 14), в контрольной группе вводили плазмозекспандер полиглюкин. Еще через час животных забивали и забирали обе почки: одну для пересадки через час собаке реципиенту, другую для исследования параметров энергетического обмена ткани почки.

В контрольной группе отношение ATP/ADP снижалось в 3 раза, а величина энергетического заряда $([ATP]+1/2[ADP])/([ATP]+[ADP]+[AMP])$ — до 0,45. В опытной группе (кровезамещение эмульсией ПФС) отношение ATP/ADP снижалось не более, чем в 2 раза, а величина энергетического заряда уменьшалась до 0,65–0,70. Отношение лактат/пируват в ткани почки у животных контрольной группы возрастало до 25–30, тогда как в опытной группе не превышало 6.

Во всех случаях при пересадке собакам-реципиентам почек, взятых у собак, леченных с помощью эмульсии ПФС, сразу же после подключения почек к кровотоку начиналось выделение мочи. В контрольной группе в 2 случаях из 5 после пересадки наблюдалось развитие реперфузионного повреждения с резким отеком ткани и полным прекращением кровотока (почки погибали). В 3 случаях в контрольной группе кровоток в пересаженной почке восстанавливался, но выделение мочи начиналось лишь через несколько часов.

Представленные данные свидетельствуют о том, что лечение геморрагического шока у собак с использованием полученной эмульсии ПФС обеспечивает существенно лучшую защиту органов от ишемического и последующего реперфузионного повреждения.

Эксперимент 5. Использование эмульсии ПФС, полученной по примеру 2, для сохранения перфузируемого сердца кролика. Непосредственно перед использованием (за 1–2 час) эмульсия ПФС смешивалась с изотоническим раствором Кребса-Хенселяйта в соотношении 2:1: 400 мл эмульсии и 200 мл солевого раствора. К 600 мл полученной смеси добавляли 80 мл 20% раствора сывороточного альбумина. Контрольный состав для сравнительных исследований содержал 600 мл солево-

го раствора с добавлением 7,2 г маннитола и 80 мл 20% раствора альбумина. Эти составы использовали в качестве перфузионной среды для сохранения сердца кролика. Перфузию по Лангендорфу осуществляли в рециркуляторном режиме при температуре 37 °С. Регистрировали время сохранения частоты и амплитуды сокращений сердца. В контроле и в опыте было взято по 8 сердец. При использовании перфузата на основе эмульсии ПФОС сократительная способность изолированного сердца кролика сохранялась в течение не менее 6–8 часов, тогда как при перфузии контрольным составом через 2 часа наблюдалось резкое снижение частоты и амплитуды сокращений вплоть до полной остановки сердца.

В заключение следует отметить, что преимущества перед прототипом и аналогами предложенной эмульсии заключаются в следующем.

Представленные рецептура и способ получения эмульсий ПФС обеспечивают получение тонкодисперсной, калиброванной эмульсии с заданным средним размером частиц в диапазоне от 0,06 до 0,195 мкм, содержащей от 2 до 40 об% ПФС, стабилизированных фосфолипидной дисперсией в биологически приемлемом водно-солевом составе. Показана высокая сохранность дисперсности и «микроструктуры» эмульсий ПФС при хранении до 18 месяцев в не замороженном состоянии, что позволяет сохранять высокую биосовместимость, выражающуюся в низком уровне реактогенности. Разработанные эмульсии ПФС пригодны для биомедицинского использования, в частности, для возмещения массивных кровопотерь, лечения геморрагического шока, предотвращения развития реперфузионных постишемических повреждений, подготовки органов к трансплантации, перфузионного сохранения изолированных органов, обладают достаточно выраженными кислородтранспортными и реологическими свойствами, обеспечивающими предотвращение и ликвидацию ишемических повреждений кислородзависимых функций митохондрий и поддержание аэробного энергетического обмена в тканях в условиях кровезамещений и лечения геморрагического шока.

Источники информации:

1. Журн. Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева, 1985, т.30, № 4, с. 387-394.
2. J.G. Riess et al.// Физиологическая активность фторсодержащих соединений (эксперимент и клиника): Сборник науч. труд.—Пушино, 1995. — с. 73-90.
3. М.В.Беркос, Автореф. диссертации канд. мед. наук, Ленинград, 1991, 24 с.
4. J.G. Riess // Chem. Rev., 2001,v.101, № 9, с. 2797-2914.
5. Патент РФ 2162692, кл.7 А 61 К 31/02, 9/10, 1999.
6. Патент РФ 2199311, кл. 7 А 61 9/107, 31/02, 2001.
7. Патент US № 3,778,381, 1973.
8. Патент US № 6,113,919, 2000.
9. Патент US № 4,866,096, А 61К 31/025, 1989.
- 10.Патент US № 5,374,624, А 61К 31/025, 1994.
- 11.Патент РФ № 2088217, 6 А 61 К 9/10, 31/02,1997.
- 12.Биофизика, 1988, т.33, № 1, с.126-129.
- 13.И.Н. Кузнецова, Автореф. диссертации докт. биол. наук, С-Пб., 1999 г., 38с.
- 14.Химико-фармацевтический журнал, 1987, № 12, с.1498-1503.
- 15.Журнал физической химии, 1993, т. 67, № 9, с. 1884-1888.
- 16.Е.И. Маевский, Автореф. диссертации докт. мед. наук, Москва, 1998 г. 36с.

«Эмульсия перфторорганических соединений медицинского назначения и способ ее получения»

Формула изобретения

1. Эмульсия перфторорганических соединений медицинского назначения, содержащая быстровыводящееся перфторорганическое соединение перфтордекалин или перфтороктилбромид, перфторорганическую добавку и фосфолипид, отличающаяся тем, что в качестве быстровыводящегося компонента используется композиция из перфтордекалина и перфтороктибромид, перфторированная добавка представляет собой смесь перфторированных третичных аминов, фосфолипиды используются в виде дисперсии в водно-солевой среде.

2. Эмульсия по п. 1, отличающаяся тем, что она содержит 2–40 объемных % перфторорганических соединений.

3. Эмульсия по п. 1, отличающаяся тем, что композиция быстровыводящихся перфторорганических соединений содержит перфтордекалин и перфтороктилбромид в соотношении от 10:1 до 1:10.

4. Эмульсия по п. 1, отличающаяся тем, что перфторорганическая добавка составляет от 1 до 50 % от суммарного содержания композиции быстровыводящихся перфторорганических соединений.

5. Эмульсия по п. 1, отличающаяся тем, что смесь перфторированных третичных аминов содержит смесь перфтортрипропиламина и его копродуктов: цис- и транс- изомеры перфтор-1-пропил-3,4-диметилпирролидона и перфтор-1-пропил-4-метилпиперидин.

6. Эмульсия по п.п. 1 и 5, отличающаяся тем, что смесь перфторированных третичных аминов дополнительно содержит перфтор-N-метилциклогексилпиперидин и его копродукты.

7. Эмульсия по п. 1, отличающаяся тем, что она содержит дисперсию фосфолипидов в водно-солевой среде в концентрации от 0,2 до 5 вес. %.

8. Эмульсия по п. 1, отличающаяся тем, что дисперсия фосфолипидов в водно-солевой среде содержит фосфолипиды яичного желтка или фосфолипиды сои, или их смесь.

9. Эмульсия по п. 1, отличающаяся тем, что дисперсия фосфолипидов в водно-солевой среде содержит адъювант в виде растительного масла в количестве от 1 до 15% от суммарного содержания фосфолипидов.

10. Эмульсия по п. 9, отличающаяся тем, что адъювантом является соевое масло.

11. Эмульсия по п. 9, отличающаяся тем, что адьювантом является подсолнечное масло.

12. Эмульсия по п. 9, отличающаяся тем, что адьювантом является касторовое масло.

13. Эмульсия по п. 9, отличающаяся тем, что адьювантом может быть смесь указанных масел, взятых в эффективном соотношении в виде двойной или тройной смеси.

14. Эмульсия по п. 1, отличающаяся тем, что в состав водно-солевой среды входят натриевые и калиевые соли хлоридов и фосфатов и моносахарид маннитол в воде для инъекций.

15. Эмульсия по п. 1, отличающаяся тем, что концентрация компонентов водно-солевой среды имеет осмотическое давление в диапазоне от 100 до 350 мосмолей на литр.

16. Эмульсия характеризуется тем, что средний диаметр частиц не превышает 0,2 мкм и находится в пределах 0,06–0,2 мкм.

17. Способ получения эмульсии перфторорганических соединений, включающий гомогенизацию под высоким давлением, отличающийся тем, что процесс проводят в несколько этапов, включающих получение дисперсии фосфолипидов в водно-солевой среде, гомогенизирование перфторорганических соединений в дисперсии фосфолипидов, тепловую стерилизацию готовой эмульсии и последующее хранение в незамороженном виде при +4 °С не менее 6 месяцев.

18. Способ получения эмульсии по п. 17, отличающийся тем, что дисперсия фосфолипидов в водно-солевой среде получается гомогенизацией под высоким давлением не менее чем 100 атмосфер с последующей тепловой стерилизацией.

19. Способ получения эмульсии по п. 17, отличающийся тем, что перфторорганические соединения гомогенизируют в дисперсии фосфолипидов под давлением от 300 до 650 атмосфер.

20. Способ получения эмульсии по п. 17, отличающийся тем, что дисперсия фосфолипидов стерилизуется при температуре 100 °С.

21. Способ получения эмульсии по п. 17, отличающийся тем, что эмульсия перфторорганических соединений стерилизуется при температуре 100 °С.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2005/000058

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <div style="text-align: right; margin-right: 100px;">A61K 31/02, 9/107, A61P 7/00, 7/08</div> <p style="margin-top: 10px;">According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC ⁷</p>		
B. FIELDS SEARCHED <p style="margin-top: 5px;">Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</p> <p style="text-align: center; margin-top: 5px;">A61K 31/02, 9/107, 9/10, 31/13, 31/445, A61L 2/02, A61P 7/00, 7/08</p> <p style="margin-top: 10px;">Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p style="margin-top: 10px;">Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</p>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	(VOROBIEV SERGEI IVANOVICH), 20.03.2003	1-21
A	(VOROBIEV SERGEI IVANOVICH), 20.03.2003	1-21
A	(DZE GRIN KROSS CORPORATION), 15.01.81	1-21
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div> <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. </div> <div> <input type="checkbox"/> See patent family annex. </div> </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">14 June 2005 (14.06.2005)</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">30 June 2005 (30.06.2005)</div>
Name and mailing address of the ISA/		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2005/000058

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: A61K 31/02, 9/107, A61P 7/00, 7/08 Согласно Международной патентной классификации (МПК-7)		
В. ОБЛАСТИ ПОИСКА: Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-7: A61K 31/02, 9/107, 9/10, 31/13, 31/445, A61L 2/02, A61P 7/00, 7/08		
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:		
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, поисковые термины):		
С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:		
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU 2200544 C1 (ВОРОБЬЕВ СЕРГЕЙ ИВАНОВИЧ) 20. 03. 2003	1-21
A	RU 2200582 C2 (ВОРОБЬЕВ СЕРГЕЙ ИВАНОВИЧ) 20. 03. 2003	1-21
A	SU 797546 A (ДЗЕ ГРИН КРОСС КОРПОРЕЙШН) 15. 01. 1981	1-21
последующие документы указаны в продолжении графы С.		
* Особые категории ссылочных документов: А документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным Е более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее L документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано) О документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д. Р документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета Т более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение Х документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности Y документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста & документ, являющийся патентом-аналогом		
Дата действительного завершения международного поиска: 14 июня 2005 (14. 06. 2005)		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске: 30 июня 2005 (30. 06. 2005)
Наименование и адрес Международного поискового органа Федеральный институт промышленной собственности РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30,1 Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		Уполномоченное лицо: Н. Лузина Телефон № 240-25-91